

**Pharmako-epigenetische Untersuchungen zur Therapieresistenz  
im Neuroblastom**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät  
Biologie und Geographie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Anja Schumacher  
aus Bochum

April 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung für Hämatologie-Onkologie der Klinik für Kinderheilkunde III des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. B. Opalka

2. Gutachter: Herr PD Dr. A. Schramm

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Herr PD Dr. L. Klein-Hitpaß

Tag der mündlichen Prüfung: 15. September 2010

# PHARMAKO-EPIGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR THERAPIERESISTENZ IM NEUROBLASTOM

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 EINLEITUNG, STAND DER FORSCHUNG.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Das Neuroblastom .....</b>	<b>12</b>
1.1.1 Definition.....	12
1.1.2 Epidemiologie .....	12
1.1.3 Klinische Symptome und Diagnostik.....	13
1.1.4 Stadieneinteilung .....	14
1.1.5 Molekulare Pathologie .....	15
1.1.6 Prognose und Risikogruppen .....	16
1.1.7 Therapie .....	16
1.1.8 Zytostatika in der Neuroblastomtherapie .....	17
1.1.9 Chemoresistenz.....	21
<b>1.2 Epigenetik.....</b>	<b>23</b>
1.2.1 Definition und molekulare Mechanismen der epigenetischen Regulation....	23
1.2.2 Mechanismus und Funktionen der DNS-Methylierung.....	24
1.2.3 DNS-Methylierung und Krebs .....	25
<b>1.3 DMH als Methode zur Identifizierung resistenzassoziierter Faktoren.....</b>	<b>27</b>
<b>2 ZIELE DER AKTUELLEN STUDIE.....</b>	<b>28</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Chemikalien .....	29
3.1.2 Verbrauchsmaterial.....	31
3.1.3 Zelllinien und Organismen .....	31
3.1.4 Primer und Oligonukleotide .....	32
3.1.5 Antikörper und Enzyme .....	32
3.1.6 Kits.....	33
3.1.7 Lösungen und Puffer .....	33
3.1.8 Geräte.....	36
<b>3.2 Methoden.....</b>	<b>36</b>
3.2.1 Kultivierung von Neuroblastomzelllinien .....	36

3.2.2	Zytotoxizitätstest und Resistenzfaktorbestimmung .....	37
3.2.3	Isolierung genomischer DNS .....	38
3.2.4	Bisulfit-Modifikation genomischer DNS .....	38
3.2.5	Isolierung von RNS .....	39
3.2.6	cDNS-Synthese aus isolierter RNS .....	40
3.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	40
3.2.8	Agarose-Gelelektrophorese .....	41
3.2.9	Real-Time PCR .....	41
3.2.10	Genexpressionschip-Analyse in primären Tumoren .....	43
3.2.11	Isolierung von Gesamtproteinextrakten .....	43
3.2.12	Isolierung von cytosolischen Proteinextrakten und Kernextrakten .....	44
3.2.13	Quantitative Proteinbestimmung .....	44
3.2.14	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) .....	45
3.2.15	Western-Blot und Detektion von Proteinen auf Membranen .....	45
3.2.16	Immunfluoreszenz-Analyse .....	46
3.2.17	Bisulfit-Sequenzierung .....	46
3.2.18	COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) .....	48
3.2.19	DNS-Demethylierung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin .....	49
3.2.20	Microarray-Analyse mit DMH (Differential Methylation Hybridisation)-Chips .....	49
3.2.21	RNS-Interferenz .....	52
3.2.22	Transformation von <i>E. coli</i> .....	55
3.2.23	Durchflußzytometer-Analyse .....	55
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der Zelllinienmodelle .....</b>	<b>57</b>
4.1.1	Bestimmung der IC <sub>50</sub> für resistente und sensitive Zellen .....	57
4.1.2	Analyse von Kreuzresistenzen .....	58
<b>4.2</b>	<b>Vergleich des DNS-Methylierungsmusters in resistenten versus sensitiven Zellen mittels DMH-Analyse .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3</b>	<b>Untersuchungen zur Expression und epigenetischen Regulation der Kandidatengene .....</b>	<b>62</b>
4.3.1	Vergleich der ZFP37-Genexpression in resistenten versus sensitiven Neuroblastomzellen im präklinischen Modell .....	62
4.3.2	Analyse der ZFP37- und IGSF4-Expression in primären Neuroblastomen .....	63
4.3.3	Untersuchungen zur epigenetischen Regulation von ZFP37 und IGSF4 .....	65
4.3.3.1	Analyse der ZFP37-Expression in Zelllinien nach DNS-Demethylierung .....	66
4.3.3.2	Analyse des DNS-Methylierungsmusters durch Bisulfit-Sequenzierung .....	70
4.3.3.3	Analyse der Methylierung der ZFP37-Genregion durch COBRA .....	74
<b>4.4</b>	<b>Funktionelle Analysen der ZFP37-Regulation in resistenten Neuroblastomzelllinien .....</b>	<b>76</b>
4.4.1	Analyse der Expression und subzellulären Verteilung des ZFP37-Proteins in resistenten versus sensitiven Zellen .....	76
4.4.2	Analyse des Zusammenhangs zwischen der Zytostatikum-Inkubation und der ZFP37-Expression .....	78

4.4.3	Analyse der Korrelation zwischen der ZFP37 Expression und Resistenzfaktoren in primären Neuroblastomen .....	80
4.4.4	Regulation von Resistenzgenen nach Modulation der ZFP37-Expression ..	82
4.4.5	Analyse des Zusammenhangs zwischen ZFP37-Expressionsminderung durch RNS-Interferenz und Chemotherapie-Resistenz .....	85
4.4.5.1	Herunterregulation der ZFP37-Expression durch siRNS-Transfektion .	85
4.4.5.2	Bestimmung der Zytotoxizität von Zytostatika in Zellen mit durch shRNS-Transfektion verminderter ZFP37-Expression .....	87
4.4.6	Analyse der Beteiligung von MDR1 an der Resistenzentwicklung in Zellen mit herunterregulierter ZFP37-Expression .....	91
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>92</b>
5.1	Präklinische Charakterisierung der Chemotherapie-Resistenz beim Neuroblastom .....	92
5.2	DMH zur Analyse von chemoresistenz-assoziierten Genen .....	93
5.3	Verminderte ZFP37-Expression in resistenten Tumorzellen .....	95
5.4	Verminderung der ZFP37-Expression durch DNS-Methylierung .....	97
5.5	Zusammenhang zwischen ZFP37 und anderen Resistenzgenen .....	98
5.6	Bedeutung von IGSF4 für die Resistenzentwicklung .....	100
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>103</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>105</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>111</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>118</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>119</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
5-Aza-dC	5-Aza-2'-deoxycytidin
bp	Basenpaare
BG	O6-Benzylguanin
BSA	Rinderserum-Albumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cDNS	kopierte DNS
CP <sup>R</sup>	Cisplatin-resistent
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin Dinukleotid
CT	Computertomographie
DMH	Differential Methylation Hybridisation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Doxo <sup>R</sup>	Doxorubicin-resistent
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und Kollegen
Etop <sup>R</sup>	Etoposid-resistent
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS Gold	Fötales Rinderserum Gold
ff	folgende [Seiten]
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GC	Guanin-Cytosin
kb	Kilo-Basen
kDA	Kilo-Dalton

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LOH	Loss of Heterozygosity (Heterozygotie-Verlust)
M	Molar (mol/Liter)
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
miRNS	mikroRNS
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NB	Neuroblastom
ng	Nanogramm
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	Potentium hydrogenium
RF	Resistenzfaktor
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNS	small interfering RNS (kurze interferierende RNS)
SRB	Sulforhodamin B
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TMZ	Temozolomid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Die gängigen SI-Einheiten sind in diesem Abkürzungsverzeichnis nicht aufgeführt, da sie als bekannt vorausgesetzt wurden.

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Strukturformel Temozolomid
- Abbildung 2 Strukturformel O6-Benzylguanin
- Abbildung 3 Methylierung von Cytosin am C-5 durch DNS-Methyltransferase
- Abbildung 4 Chemischer Ablauf der Bisulfit-induzierten Desaminierung von Cytosin zu Uracil
- Abbildung 5 Schematische Darstellung der Probenaufbereitung für die genomweite Analyse des DNS-Methylierungsmusters mittels DMH
- Abbildung 6 ZFP37-Expression in LAN1 und Kelly Zellen, die resistent sind gegen die Behandlung mit Doxorubicin oder Cisplatin im Vergleich zum Wildtyp, gemessen durch semiquantitative PCR
- Abbildung 7 Box-Plot-Darstellung der ZFP37-Expression in 68 primären Neuroblastomen aller Stadien, analysiert mittels semiquantitativer Real-Time PCR
- Abbildung 8 IGSF4-Expression in Neuroblastomen des Stadiums 4 im Vergleich zu Tumoren aus den Stadien 1 bis 3 oder 4s, ermittelt mit Hilfe der Microarray-Analyse von 251 primären Neuroblastomen
- Abbildung 9 MTT-Test mit a) LAN1 WT und b) LAN1 DoxoR-Zellen nach Inkubation für 4 Tage mit steigenden Dosen 5-Aza-2'-deoxycytidin
- Abbildung 10 Expression von CD44 in LAN1 WT-Zellen nach DNS-Demethylierung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin, semiquantitative PCR Analyse
- Abbildung 11 Semiquantitative PCR Analyse der ZFP37-Expression in LAN1 Zellen nach DNS-Demethylierung durch 5-Aza-2'-deoxycytidin
- Abbildung 12 Semiquantitative PCR mit ZFP37 in Kelly Zellen nach DNS-Demethylierung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin
- Abbildung 13 Schematische Darstellung der kodierenden Sequenzen, CpG Inseln und mittels COBRA und Bisulfit-Sequenzierung analysierten Sequenzen des ZFP37-Gens
- Abbildung 14 DNS-Methylierungsmuster der auf dem DMH-Chip befindlichen Sequenz in resistenten und sensitiven Zellen
- Abbildung 15 Auswertung des Methylierungsgrades der einzelnen CpGs in CGI-1 in LAN1 WT Zellen durch Bisulfit-Sequenzierung



- Abbildung 16 Auswertung des Methylierungsgrades der einzelnen CpGs in CGI-1 in LAN1 Doxo<sup>R</sup> Zellen durch Bisulfit-Sequenzierung
- Abbildung 17 Darstellung des Methylierungsgrades der CpGs in der Promotorregion von IGSF4 in Abhängigkeit zur Expressionshöhe des Gens analysiert durch Bisulfit-Sequenzierung
- Abbildung 18 COBRA mit TaqI der CGI-2 Sequenz im WT und in Doxo<sup>R</sup> Zellen
- Abbildung 19 COBRA mit TaqI der CGI-3 Sequenz im WT und in Doxo<sup>R</sup> Zellen
- Abbildung 20 Western-Blot-Analyse der ZFP37-Proteinexpression in Doxo<sup>R</sup> LAN1 Zellen im Vergleich zum WT
- Abbildung 21 Lokalisation des ZFP37-Proteins in LAN1 WT Zellen
- Abbildung 22 Lokalisation des ZFP37-Proteins in LAN1 Doxo<sup>R</sup> Zellen
- Abbildung 23 ZFP37-Expression in LAN1 WT Zellen unter Behandlung mit Doxorubicin, bestimmt mittels Western-Blot
- Abbildung 24 ZFP37-Proteinexpression in Kernextrakten a) In LAN1 WT Zellen, b) in Doxo<sup>R</sup> LAN1 Zellen unter Behandlung mit Doxorubicin
- Abbildung 25 Inverse Korrelation zwischen der logarithmierten ZFP37- und MGMT-Expression in 69 Tumorproben aus primären Neuroblastomen
- Abbildung 26 Inverse Korrelation zwischen der logarithmierten ZFP37- und ABCC4-Expression in 88 primären Neuroblastomen
- Abbildung 27 ZFP37-Expression in LAN1 Zellen nach Transfektion mit ZFP37-shRNS, bestimmt durch semiquantitative PCR
- Abbildung 28 ZFP37-Expression nach shRNS-Transfektion in Einzelklonen im Vergleich zum Wildtyp, gemessen mittels Real-Time PCR
- Abbildung 29 ABCC4 und MGMT-Expression gemessen durch Real-Time PCR in Klonen mit ZFP37 Herunterregulation im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen
- Abbildung 30 a) ZFP37-Expression in LAN1 Zellen gemessen durch semiquantitative PCR, b) Zellvitalität gemessen mit Hilfe des MTT-Tests jeweils 24 und 48 Stunden nach siRNS-Transfektion im Vergleich zur Negativkontrolle
- Abbildung 31 Vergleich der Zytotoxizität steigender Dosen Doxorubicin auf Zellen, deren ZFP37-Expression durch siRNS-Transfektion herunterreguliert wurde versus untransfizierte Kontrollzellen

- Abbildung 32 Die  $IC_{50}$  für Doxorubicin in Zellen mit durch shRNS-Transfektion unterdrückter ZFP37-Expression und Kontrollzellen gemessen im MTT nach drei Tagen Inkubation mit Doxorubicin
- Abbildung 33 Bestimmung der  $IC_{50}$  von Irinotecan in LAN1 WT Zellen, mit ZFP37-shRNS transfizierten Zellen und Vektorkontrollzellen mittels MTT
- Abbildung 34 Zytotoxizitätstest für die Kombinationstherapie aus BG, TMZ und IRN mit kontrolltransfizierten Zellen und Zellen mit herunterregulierter ZFP37-Expression
- Abbildung 35 Expression des MDR1 Gens in Zellen mit herunterregulierter ZFP37-Expression, Wildtypzellen und Doxorubicin-resistenten Zellen

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Stadieneinteilung nach INSS
Tabelle 2	Inkubationstemperatur und –dauer der TaqMan (interessierendes Gen) und SYBR-Green basierten (Referenzgen) Real-Time PCR
Tabelle 3	IC <sub>50</sub> -Dosen in LAN1 Zellen in µg/ml Medium für Doxorubicin, Etoposid und Cisplatin sowie Resistenzfaktoren für die resistenten Sublinien
Tabelle 4	IC <sub>50</sub> -Dosen der Zytostatika für die sensitiven Wildtypzellen und Doxorubicin-, Cisplatin-, bzw. Etoposid-resistenten Kelly Zellen mit dem jeweils dazugehörigen Resistenzfaktor
Tabelle 5	Resistenzfaktoren bestimmt durch SRB-Analyse zur Ermittlung von Kreuzresistenzen in LAN1
Tabelle 6	Abweichend methylierte Gene, detektiert in mindestens zwei der Cisplatin-, Etoposid- oder Doxorubicin-resistenten LAN1 Zellen, im Vergleich zu sensitiven Zellen
Tabelle 7	Resistenzfaktoren der gegen Doxorubicin, Etoposid oder Cisplatin resistent gezüchteten LAN1 und Kelly Zellen im Vergleich zum Wildtyp

# **1 Einleitung, Stand der Forschung**

## **1.1 Das Neuroblastom**

### **1.1.1 Definition**

Beim Neuroblastom handelt es sich um einen Tumor des Kindesalters, der sich aus postganglionären sympathischen Neuroblasten der Neuralleiste entwickelt. Die Symptome sind sehr vielfältig, abhängig von der Lokalisation, Größe und Metastasierung des Tumors. Am häufigsten sind die Tumoren in der Nebenniere und entlang des sympathischen Grenzstrangs lokalisiert. Dabei treten 65% der Tumoren im Abdomen auf, von diesen wiederum die Hälfte im Nebennierenmark. Des weiteren wird der Tumor häufig im Brustkorb, Becken und Kopf-Hals-Bereich diagnostiziert (Maris, Hogarty et al. 2007).

Diese Tumorerkrankung besitzt ein außergewöhnlich breites Spektrum ihres klinischen Verhaltens: Sie zeigt sowohl aggressive Tumoren mit rascher Progression und Therapieversagen trotz multimodaler Hochdosis-Chemotherapie als auch eine spontane Regression des Tumors oder die Differenzierung zu benignen Ganglioneuomen.

### **1.1.2 Epidemiologie**

Das Neuroblastom ist der häufigste solide extrakranielle Tumor des Kindesalters. Mit einer Inzidenz des Neuroblastoms von ca. 1:7000 Lebendgeburten macht diese Erkrankung 7,6 % aller Krebserkrankungen im Kindesalter unter 15 Jahren aus. In Deutschland erkranken etwa 150 Kinder pro Jahr neu an einem Neuroblastom (Angaben des Deutschen Kinderkrebsregisters, Jahresbericht 2008).

Die Erkrankungswahrscheinlichkeit sinkt mit zunehmendem Lebensalter: 90% der Neuroblastomerkrankungen werden bis zum Ende des 5. Lebensjahres diagnostiziert, etwa 40% bereits im Säuglingsalter (B. Kremens, A. Eggert, Uroonkologie 2007).

### **1.1.3 Klinische Symptome und Diagnostik**

Die Symptome der Neuroblastomerkrankung sind stark abhängig von der Lokalisation und Ausdehnung des Tumors, bzw. der Metastasen. Die Lokalisation des Tumors im Abdomen verursacht meist gastrointestinale Symptome wie Bauch- oder Rückenschmerzen, Obstipation, Meteorismus oder Harnverhalten durch Druck des Tumors auf den Harnleiter mit der Gefahr einer Hydronephrose. Ist der Tumor primär thorakal angesiedelt, kann es zu Symptomen wie Husten, Kurzatmigkeit oder Luftnot, Dysphagie und Schmerzen im Brustbereich kommen. Eine Ansiedlung im Kopf-Hals-Bereich kann sich durch livide subkutane Knoten und im Horner-Syndrom mit einseitigem Zurücksinken des Augapfels, Miosis und hängendem Lid zeigen. Metastasen können in diesem Bereich zudem ein Brillenhämatom auslösen. Tumoren im Grenzstrang der Wirbelsäule können in den Wirbelsäulenkanal einwachsen und zu neurologische Ausfällen in Form motorischer Störungen oder Sensibilitätsstörungen bis hin zur Querschnittssymptomatik führen. Lymphogene oder hämatogene Metastasen verursachen u.a. Lymphödeme oder bei Lokalisation im Knochen oder Knochenmark starke Knochenschmerzen.

Zu den häufigen Allgemeinsymptomen, die das Neuroblastom begleiten, zählen Schmerzen, Fieber, Anämie, Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust. 90% der Neuroblastome verursachen eine Überproduktion von Katecholaminen, die zu Hypertonie, Diarrhoe, Gereiztheit, Erröten sowie Schwitzen auf einer Körperseite führen können.

Da viele Patienten mit Neuroblastom zunächst keine Symptome aufweisen, wird der Tumor häufig zufällig bei einer Röntgen- oder Ultraschalluntersuchung entdeckt oder bei Routineuntersuchungen im Abdomen ertastet. Zur Diagnose werden die eindeutige histologische Diagnose aus dem Tumorgewebe oder ein positiver Befund im Knochenmarkaspirat und die labordiagnostische Bestimmung erhöhter Werte von Katecholaminabbauprodukten (Homovanillinsäure, Vanillinmandelsäure) im Harn und/oder Serum herangezogen (Brodeur, Pritchard et al. 1993); (Brodeur, Seeger et al. 1988). Erhöhte Konzentrationen von Dopamin und der neuronspezifischen Enolase (NSE) weisen ebenfalls auf eine Neuroblastomerkrankung hin. Eher unspezifische Marker sind die Laktatdehydrogenase- und Ferritinspiegel (Hann, Levy et al. 1980), allerdings sind sie von prognostischer Bedeutung. Zu den bildgebenden

Diagnoseverfahren zählen die Sonographie, CT und MRT, die auch Auskunft über die Lokalisation und Größe des Tumors sowie über das Vorhandensein von Metastasen Auskunft geben können. Die Szintigraphie mit Meta-Iod-Benzylguanidin, welches sich über die Katecholaminrezeptoren im Tumor anreichert, dient ebenfalls dem Nachweis von Metastasen und Primär- oder Resttumorgewebe (Kimmig, Brandeis et al. 1986). Knochenmetastasen können zudem durch Technetiumszintigraphie detektiert werden. Zum Diagnosezeitpunkt haben sich bereits bei mehr als 50% der Patienten Metastasen gebildet.

#### 1.1.4 Stadieneinteilung

Die Einteilung des Neuroblastoms in die Stadien 1 bis 4 und 4S erfolgt nach dem Internationalen Neuroblastom Stadiensystem (INSS) nach (Brodeur, Seeger et al. 1988); (Brodeur, Pritchard et al. 1993); (Ikeda, Iehara et al. 2002) (s. Tabelle 1, Seite 14).

**Tabelle 1: Stadieneinteilung nach INSS**

<b>Stadium</b>	<b>Definition</b>
Stadium 1	lokalisierter Tumor, makroskopisch komplette Resektion, kein Lymphknotenbefall
Stadium 2a	unilateral begrenzter Tumor, unkomplette Resektion, kein Lymphknotenbefall
Stadium 2b	unilateral begrenzter Tumor, ipsilateraler Lymphknotenbefall
Stadium 3	Nicht resektabler unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie mit/ohne Lymphknotenbefall oder unilateral lokalisierter Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall oder nichtresektabler Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration / Lymphknotenbefall
Stadium 4	Disseminierter Tumor mit Fernmetastasen in Lymphknoten, Leber, Haut, Knochenmark, Knochen oder anderen Organen
Stadium 4S	Lokalisierte Tumor, Metastasen in Leber, Haut und/oder Knochenmark, nur Kinder bis 1 Jahr

Neuroblastome der Stadien 1 bis 3 und 4S haben eine deutliche bessere Prognose als Tumoren des Stadiums 4. Beim Stadium 4S handelt es sich um einen Sonderfall: Trotz Metastasierung des Tumors kommt es häufig zu einer spontanen Tumorregression, so dass dieses Stadium mit einer sehr guten Prognose einhergeht.

### **1.1.5 Molekulare Pathologie**

Zur Prognoseabschätzung und Therapiewahl werden zusätzlich molekulargenetische Untersuchungen des Tumors herangezogen (Schwab, Westermann et al. 2003). Bei dem Onkogen MycN handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der den Zellzyklus, die Zellproliferation und Apoptose reguliert (Grotzer, Castelletti et al. 2009). Hohe Konzentrationen des Dimers aus MycN und Max hemmen die Zelldifferenzierung und fördern die Proliferation. Eine Amplifikation des MycN-Gens, die bei 20-25% der Neuroblastome vorliegt, geht mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Brodeur, Seeger et al. 1984) und einer ungünstigen Prognose mit raschem Fortschreiten der Erkrankung einher (Seeger, Brodeur et al. 1985). Die Höhe der Proteinexpression spielt dabei eine untergeordnete Rolle (Tang, Zhao et al. 2006). Für Patienten unter einem Jahr mit einem metastasierten Neuroblastom liegt das ereignisfreie Überleben nach drei Jahren mit MycN-Amplifikation bei 10%, ohne MycN-Amplifikation bei 93% (Brodeur 2003).

Die am häufigsten beobachtete Deletion im Neuroblastom ist die von 1p. Sie geht meist mit einer MycN-Amplifikation, fortgeschrittener Erkrankung und einem Lebensalter der Patienten >1 Jahr einher (Weinstein, Katzenstein et al. 2003). Weitere häufige chromosomale Abnormalitäten sind ein Zugewinn des Chromosoms 17q oder LOH der Chromosomenabschnitte 11q oder 14q. Der prognostische Wert des 17q Zugewinns wird derzeit kontrovers diskutiert (Bown, Cotterill et al. 1999) und (Spitz, Hero et al. 2003). Das Rückfallrisiko bei Patienten mit lokalen Tumoren und LOH von 11q ist erhöht, so dass diese Patienten mit einer intensivierten Therapie behandelt werden sollten (Spitz, Hero et al. 2006).

Als unabhängiger prognostischer Faktor gilt der DNS-Index (Cohn, Rademaker et al. 1990). Säuglinge mit Tumoren mit triploidem DNS-Gehalt zeigen meist eine gute Langzeit-Überlebensrate und niedrigstadiige Tumoren. Ein diploider Chromosomensatz

ist in dieser Altersgruppe mit einer negativen Prognose assoziiert (Look, Hayes et al. 1984).

Die Expression der Neurotrophinrezeptoren TrkA und TrkB ist ebenfalls von prognostischer Bedeutung. Wie bereits vor 15 Jahren gezeigt wurde (Nakagawara, Arima-Nakagawara et al. 1993), korreliert die TrkA Expression mit einer günstigen Prognose, die von TrkB mit einer ungünstigen Prognose und Therapieresistenz (Nakagawara, Azar et al. 1994); (Brodeur 2003). Eine hohe TrkB-Expression geht zudem häufig mit einer MycN-Amplifikation einher (Brodeur, Minturn et al. 2009).

### **1.1.6 Prognose und Risikogruppen**

Für Patienten des Stadiums 1 und 2 liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 95-98%, mit Stadium 3 und 4S bei etwa 75% und bei Hochrisikopatienten mit Stadium 4 Neuroblastomen leider noch bei nur 33% (NB2004-Studie). Eine gute Prognose haben erkrankte Kinder unter einem Jahr. Generell ließ sich für jedes Tumorstadium zeigen, dass bei jüngeren Kindern die Prognose besser ist als bei Kindern mit höherem Alter (Breslow and McCann 1971).

Von großer prognostischer Aussagekraft ist überdies die Histopathologie des Tumors. Nach der International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC oder Shimada System) von 1999 (Shimada, Ambros et al. 1999) werden die Tumoren nach dem Grad der Differenzierung der Neuroblasten, ihrem Stromagehalt, ihrem Mitosis-Karyorrhexis-Index (Mitosen und Apoptosen pro 5000 Zellen) in Abhängigkeit vom Alter der Patienten einer günstigen oder ungünstigen Prognose zugeordnet.

Für die Zuordnung in eine der drei Risikogruppen (gute, intermediäre und schlechte Prognose) werden in Deutschland von der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) in der NB2004 Studie die Stadienzuordnung laut INSS, das Alter der Patienten, der MycN- und 1p36-Status betrachtet, die US-amerikanische Children's Oncology Group (COG) berücksichtigt statt der 1p36 Deletion die INPC Zuordnung und den DNS-Index.

### **1.1.7 Therapie**

Die Therapie des Neuroblastoms erfolgt risikoadaptiert durch chirurgische Entfernung des Tumors, Strahlen- und/oder Chemotherapie.



Bei Patienten mit niedrigem Risiko ist meist die alleinige chirurgische Resektion des Tumors ausreichend. Man erreicht hierdurch bei Patienten mit Stadium 1 und 2 Neuroblastomen eine Überlebensrate von über 95% (Perez, Matthay et al. 2000). Zum Teil ist ergänzend eine milde Chemo- oder Strahlentherapie neoadjuvant oder bei einer Progression der Erkrankung notwendig. Da die Rate der spontanen Remissionen bei Patienten mit Stadium 4S Neuroblastomen relativ hoch ist, müssen sie häufig initial nicht therapiert werden, sondern es wird lediglich der Verlauf der Erkrankung beobachtet.

Patienten mit intermediärem Risiko werden chirurgisch sowie mit einer Polychemotherapie und/oder Strahlentherapie behandelt. Bei der Therapieauswahl ist es weiterhin eine Herausforderung, je nach Tumorbiologie ein gutes Gleichgewicht zwischen möglichst geringer Therapiebelastung –auch um Folgeschäden wie Organtoxizitäten bis hin zur Entwicklung von Sekundärmalignomen zu vermeiden- und hohen Heilungsraten zu finden.

Bei Hochrisikopatienten mit disseminierten Stadium 4 Neuroblastomen wird der Tumor ebenfalls soweit wie möglich chirurgisch entfernt. Sie erhalten zusätzlich eine intensive Polychemotherapie mit u.a. Doxorubicin, Etoposid, Cisplatin, Cyclophosphamid, Vincristin oder 13-cis Retinolsäure und werden bestrahlt (Schor 2009). Eventuell werden die Patienten mit einer Megatherapie behandelt, bei der die Zytostatikadosen so hoch gewählt sind, dass sie nicht nur die Krebszellen sondern auch die blutbildenden Knochenmarkszellen zerstören, gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation.

In der Regel zeigen die Tumoren initial ein gutes Ansprechen auf die Polychemotherapie. Bei disseminierten Stadium 4 Neuroblastomen entwickeln sich jedoch häufig Rezidive, die aufgrund ihrer Resistenz trotz multimodaler Therapie zu schlechten Überlebensraten führen (Matthay, Villablanca et al. 1999).

### **1.1.8 Zytostatika in der Neuroblastomtherapie**

#### **Doxorubicin**

Doxorubicin gehört zur Gruppe der Anthracycline und wird hauptsächlich aus *Streptomyces peucetius* isoliert. Seine zytotoxische Wirkung beruht auf mehreren Mechanismen: Durch seine planare Tetracyclinstruktur interkaliert es in die DNS und stört die DNS- und RNS-Synthese. Doxorubicin erzeugt DNS-Strangbrüche durch die Biotransformation zu freien Radikalen (Eisele, Klein-Hitpass et al. 2007), und indem es

das Enzym Topoisomerase II hemmt. Zusätzlich bindet es an Zellmembranbestandteile, wodurch sich die Membranpermeabilität erhöht. Die Zytotoxizität von Doxorubicin ist am stärksten in der S-Phase des Zellzyklus.

Als eine der wichtigsten Nebenwirkungen ist seine Kardiotoxizität zu nennen, die sich in reversiblen Herzrhythmusstörungen bis hin zu irreversiblen Kardiomyopathien ausprägen kann.

### **Etoposid**

Bei Etoposid handelt es sich um ein partialsynthetisches Derivat des Podophyllotoxins. Es wirkt als Topoisomerase II Inhibitor. Während der DNS-Replikation bindet die Topoisomerase II an doppelsträngige DNS, öffnet diese zum Entwinden und fügt sie nach erfolgter Replikation wieder zusammen. Etoposid hemmt somit die Zellteilung, und es stabilisiert die Topoisomerase II-Bindung an die gespaltene DNS, so dass es zu bleibenden Doppelstrangbrüchen und folglich zur Apoptose kommt.

Zu den Nebenwirkungen, die Etoposid verursacht, zählen Hypotonie und eine dosislimitierend wirkende Myelosuppression. Wegen seiner synergistischen Wirkung mit Alkylantien und Platinverbindungen wird es häufig in Kombination mit diesen eingesetzt.

### **Cisplatin**

Das planare Cisplatin Molekül besteht aus einem zweiwertigen Platinmolekül, das cis-ständig zwei Chlorliganden und zwei Aminogruppen komplex gebunden hat. Intrazellulär wird es durch Umwandlung in einen elektrophilen Diaquokomplex nach Austausch der Chloridionen gegen Wasser aktiviert. Der aktivierte Wirkstoff bindet bevorzugt an das N-7 von Guanin oder Adenin und erzeugt so Intra- oder seltener Interstrang-Quervernetzungen der DNS, die zur Apoptose führen. Zudem wurde gezeigt, dass Cisplatin auch durch ER-Stress Apoptose induzieren kann (Nawrocki, Carew et al. 2005).

Zu den Nebenwirkungen der Cisplatintherapie zählen starke Übelkeit und Erbrechen, Myelosuppression, Neurotoxizität, bei Kindern stark ausgeprägte Oto- und dosislimitierende Nephrotoxizität.

## **Irinotecan**

Das Camptothecin-Derivat Irinotecan wirkt als Topoisomerase I Inhibitor. Topoisomerase I spaltet im Gegensatz zur Topoisomerase II nur einen DNS-Strang, was die freie Rotation der DNS während der Replikation ermöglicht. Die Hemmung dieses Enzyms führt durch die Induktion eines Einzelstrangbruchs zur Apoptose. Zu den schweren Nebenwirkungen, die Irinotecan verursacht, zählen u.a. eine dosislimitierende, verzögert einsetzende schwere Diarrhoe sowie das akute cholinerge Syndrom.

## **Neuere Therapieformen**

Neuroblastompatienten mit mittlerem oder hohem Risiko werden häufig mit 13-cis-Retinsäure behandelt (Wagner and Danks 2009). Durch die Interaktion der Retinsäure mit nukleären Rezeptoren wird der Transkriptionsfaktorkomplex Aktivatorprotein-1 (AP-1) und dadurch eine erhöhte Zellproliferation gehemmt. Zudem induzieren Retinoide die Zelldifferenzierung und wirken immunmodulatorisch (Miller 1998).

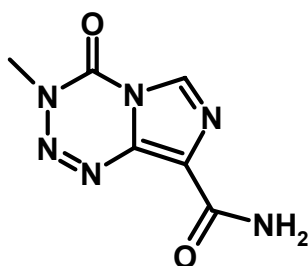
Ein vielversprechender Ansatz zur Immuntherapie, der derzeit in Phase III Studien verfolgt wird, ist die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen das Gangliosid GD2. GD2 ist ein Glykolipid, das als Oberflächenantigen in hohem Maße von Neuroblastomzellen exprimiert wird (Schulz, Cheresch et al. 1984). *In vitro* führt die Behandlung mit GD2-Antikörpern dosisabhängig zur Apoptose (Kowalczyk, Gil et al. 2009), *in vivo* hemmen der chimäre ch14.18 und der murine 3F8 Antikörper das Tumorstwachstum. In einer erfolgversprechenden COG Phase III Studie wird derzeit überprüft, ob die Kombination einer Immuntherapie aus den Zytokinen Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor, Interleukin-2 und einem Antikörper gegen GD2 mit einer 13-cis-Retinsäure-Behandlung die Rate für das ereignisfreie Überleben und das Gesamtüberleben von Hochrisikopatienten signifikant erhöht (Yu, Gilman et al. 2009, Abstract übermittelt an das Journal of Clinical Oncology). Die Verträglichkeit dieser Kombinationstherapie wurde bereits belegt (Gilman, Ozkaynak et al. 2009).

## **In der Entwicklung befindliche, molekulare Therapien**

Durch molekularbiologische Untersuchungen wurden in den letzten Jahren eine Reihe weiterer Targets identifiziert, die die Möglichkeit bieten können, die Neuroblastomerkrankung gezielt zu therapieren. Dazu gehören z.B. Galectin-1, Bcl-2

oder MGMT. Die Galectin-1 Expression korreliert in primären Neuroblastomen mit der Expression von TrkB und ist in aggressiven, rezidivierenden Tumoren hochreguliert. *In vitro* führt die Hemmung von Galectin-1 zu einer verminderten Zellproliferation und –migration (Cimmino, Schulte et al. 2009), was einen interessanten Therapieansatz für invasive Neuroblastomerkrankungen darstellt. Das Proto-Onkogen Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) wirkt antiapoptotisch (Reed, Meister et al. 1991) und wird in verschiedenen Krebsarten, wie z.B. bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) überexprimiert. Für die Behandlung Bcl-2 überexprimierender Tumoren könnten die miRNSs (mikroRNS) miR-15 und miR-16 von Nutzen sein, die posttranskriptional die Bcl-2 Expression herunterregulieren und im präklinischen CLL Modell zur Apoptose führen (Cimmino, Calin et al. 2005). Für Neuroblastomzellen wurde *in vitro* gezeigt, dass auch die Wirkung des neulich identifizierten potentiellen Tumorsuppressors miR-34a vermutlich auf einer Hemmung der Gene Bcl-2 und MYCN beruht (Cole, Attiyeh et al. 2008).

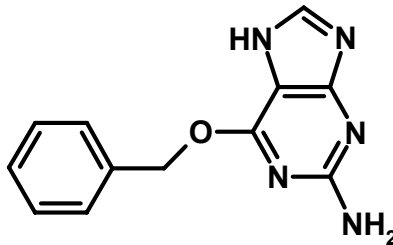
Bei MGMT handelt es sich um eine Methylguanin-DNS Methyltransferase (MGMT), die als DNS-Reparaturprotein fungiert. Aktuelle Studien zeigen, dass MGMT in Neuroblastomen die Wirkung des alkylierenden Zytostatikums Temozolomid (TMZ) (Handelsname Temodal®) aufheben kann. Bei TMZ (s. Abbildung 1) handelt es sich um ein Prodrug, dessen aktiver Metabolit die DNS an der O6-Position von Guanin methyliert und dadurch zytotoxisch wirkt. Im Gegensatz zu den anderen bisher genannten Zytostatika kann es oral verabreicht werden. Als sehr häufige Nebenwirkungen kann es u.a. Thrombozytopenien und Neutropenien verursachen.



**Abbildung 1: Strukturformel Temozolomid (TMZ)**

Erfolgversprechend ist die Kombinationstherapie aus Irinotecan mit Temozolomid und O6-Benzylguanin (BG). Laufende klinische Studien mit intensiv vorbehandelten Neuroblastompatienten, die einen Rückfall erlitten hatten, konnten die Wirksamkeit und

Verträglichkeit einer Kombinationstherapie von Irinotecan mit Temozolomid zeigen (Wagner, Crews et al. 2004). TMZ wirkt synergistisch mit Camptothecin-Derivaten (Houghton, Stewart et al. 2000) (Patel, Elion et al. 2000). Da die TMZ-Wirkung durch eine hohe MGMT-Expression in den Zellen aufgehoben werden kann (s. 1.1.9), ist es laut (Wagner, McLendon et al. 2007) sinnvoll, die MGMT-Wirkung durch BG (s. Abbildung 2) zu blockieren. Sie zeigten die Effektivität und synergistische Wirkung der Kombinationstherapie aus BG gefolgt von TMZ und Irinotecan, die in weiteren Studien überprüft wird. Die inhibierende Wirkung von BG resultiert aus dem gezielten Transfer der Benzylgruppe an das aktive Zentrum der Methyltransferase MGMT.



**Abbildung 2: Strukturformel O6-Benzylguanin**

### **1.1.9 Chemoresistenz**

Ein wichtiger Resistenzmechanismus der Zellen gegen Doxorubicin ist u.a. der Transport von Zytostatika aus der Zelle durch das membranständige P-Glykoprotein 1, kodiert durch das Gen MDR1 (multidrug resistance 1). Eine hohe MDR1-Aktivität resultiert in erniedrigten intrazellulären Zytostatikakonzentrationen. MDR1 steht im Verdacht, auch an der Resistenz gegen Topoisomerase-Inhibitoren beteiligt zu sein.

Eine Resistenz gegen Etoposid entsteht zudem durch eine veränderte Topoisomerase II-Aktivität. Zwischen Zytostatika, die die Topoisomerase I und II inhibieren, besteht eine Kreuzresistenz (Keshelava, Groshen et al. 2000).

Die Resistenzmechanismen gegen Cisplatin sind vielfältig und noch nicht abschließend geklärt. Unter anderem soll eine verstärkte DNS-Reparatur, z.B. in Form einer erhöhten Expression des Nukleotid-Exzisionsreparatur-Gens ERCC1, an der Resistenzentwicklung beteiligt sein. ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation Group 1) entfernt als Bestandteil des Nukleotid-Exzisionsreparatur-Komplexes zusammen mit XPF veränderte Nukleotide, bzw. Cisplatin-DNS-Addukte aus dem

beschädigten DNS-Strang. Eine hohe ERCC1-Aktivität bewirkt dabei durch eine Aufhebung der Cisplatinwirkung eine verminderte Apoptoserate und eine verminderte Gesamtüberlebensrate in verschiedenen Tumorarten (Martin, Hamilton et al. 2008) (Schettino, Bareschino et al. 2008). Außerdem wird Cisplatin vermutlich durch Bindung an die SH-Gruppen von Metalloproteinen und Glutathion inaktiviert. Während eine MDR1 Beteiligung ausgeschlossen werden kann, scheinen Kupfer Transporter eine Rolle für die Resistenzentwicklung zu spielen. Zellen mit einer Überexpression von ATP7A (Cu<sup>2+</sup>-transporting, alpha polypeptide) oder ATP7B (Cu<sup>2+</sup>-transporting, beta polypeptide) zeigten eine verminderte Sensitivität gegen Cisplatin durch eine verstärkte Absonderung von Cisplatin in Vesikel, bzw. einen gesteigerten Transport des Zytostatikums aus der Zelle. Die Beteiligung von MRP (Multidrug Resistant Protein) Transportern an der Cisplatinresistenz wird kontrovers diskutiert (Rabik and Dolan 2007). Die Beteiligung des Transportproteins MRP4 an der Resistenz gegen Irinotecan in Neuroblastomen wurde von (Norris, Smith et al. 2005) nachgewiesen.

Ein wichtiger Mechanismus zur Resistenz gegen Temozolomid beruht auf einer starken Expression der Methylguanin-DNS Methyltransferase MGMT. Sie hebt den Effekt von Temozolomid auf, indem sie als DNS-Reparaturprotein die Methylgruppen, mit denen Temozolomid die DNS alkyliert hat, entfernt (Gerson 2002). Zudem stehen niedrige Konzentrationen der Mismatch Reparatur Enzyme MSH- und MLH-1 im Verdacht, an der Resistenz beteiligt zu sein. Für die Apoptoseinduktion scheinen höhere Konzentration nötig zu sein, in Neuroblastomen ist dieser Mechanismus jedoch vermutlich nicht ausschlaggebend (Wagner, McLendon et al. 2007).

Es gibt zwei Strategien zur Bekämpfung von Therapieresistenzen: Ein Ansatz ist die Entwicklung neuer Therapieoptionen. Der zweite, der in dieser Arbeit verfolgt wird, besteht darin, Resistenzentwicklungen gegen Zytostatika zu verstehen und zu überwinden.

## 1.2 Epigenetik

### 1.2.1 Definition und molekulare Mechanismen der epigenetischen Regulation

Vererbare, reversible Einflüsse auf den Phänotyp, bzw. auf Gene oder Chromosomen, die nicht auf einer Änderung der Basenfolge der DNS beruhen, bezeichnet man -im Gegensatz zur genetischen- als epigenetische Regulation. Ein wichtiger Mechanismus der epigenetischen Regulation ist die DNS-Methylierung (s. 1.2.2), deren Beteiligung an der Entwicklung der Chemotherapie-Resistenz in dieser Arbeit analysiert wird. Von großer Bedeutung ist ebenso die Methylierung und Acetylierung der Seitenketten von Histonen im Nukleosom. Z.B. kann die Histonacetylierung durch Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) die Genexpression aktivieren, indem sie den Histon-DNS-Komplex destabilisiert. Histon-Deacetylasen (HDAC) bewirken vermutlich eine Zunahme an positiv geladenen, überwiegend lysin- und argininreichen N-terminalen Histonden, die mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNS interagieren. Dies führt zu einer stärkeren Verdichtung der Nukleosomen und damit zur transkriptionellen Inaktivierung, da die Gene in dieser Region schlechter zugänglich sind. Die Methylierung des Lysin-4 in Histon H3 durch Methyltransferasen ist mit der Aktivierung der Genexpression assoziiert, während die Methylierung des Lysin-9 von H3 zur transkriptionellen Repression führt (Li 2002).

Zudem kann die Genaktivität durch RNS-Interferenz mit siRNS (small interfering RNS) oder miRNS reguliert werden. Hierbei verursachen kurze RNS-Sequenzen aus 21 - 23 Nukleotiden die Degradation definierter mRNA bevor die Translation stattfinden kann oder blockieren gensepezifisch die Translation, bzw. die Transkription (Tomari and Zamore 2005).

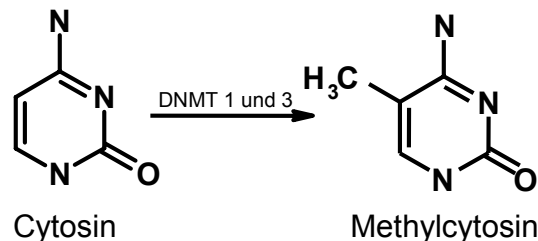
Die physiologische Bedeutung der epigenetischen Modulation liegt u.a. in der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms, der gewebsspezifischen Genexpression, dem genomischen Imprinting oder der Prägung und dem Schutz des Genoms vor fremder DNS.

Bei der X-Chromosom Inaktivierung wird in den somatischen Zellen weiblicher Säugetiere ein X-Chromosom durch die Bildung von X-Inaktivierung-spezifisches-Transkript-RNS (XIST-RNS) transkriptionell inaktiviert. Die XIST-RNS umhüllt das

verdichtete Chromosom von der Mitte ausgehend. In Kombination mit der DNS-Methylierung ist das zweite X-Chromosom somit transkriptions-inaktiv.

### 1.2.2 Mechanismus und Funktionen der DNS-Methylierung

Die DNS-Methylierung erfolgt am C-5 von Cytosinen in Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden (CpG) durch DNS-Methyltransferasen (DNMT) (vgl. Abbildung 3). DNMT1 wird als Erhaltungs-Methyltransferase bezeichnet, da sie vorrangig hemimethylierte CpGs eines neu synthetisierten DNS-Strangs während der DNS-Replikation methyliert, um das Methylierungsmuster der Zellen während der Proliferation zu erhalten. DNMT3a und DNMT3b fungieren als de novo-Methyltransferasen während der embryonalen Entwicklung.



**Abbildung 3: Methylierung von Cytosin am C-5 durch DNS-Methyltransferase (DNMT)**

Die CpGs liegen vornehmlich in so genannten CpG-Inseln, mindestens 200 bp lange Sequenzen mit einem GC Gehalt von mindestens 50% und einem Verhältnis aus beobachteten zu erwarteten Methylierungen von 0,6 (Gardiner-Garden and Frommer 1987). Diese CpG-Inseln liegen häufig in der Promotorregion von Genen.

Durch Methylierung der DNS der Promotorregion können gewebsspezifisch Gene transkriptionell abgeschaltet werden. Die Methylierung verhindert, dass die von diesen Genen kodierten Proteine in den Zell- oder Gewebetypen synthetisiert werden (Costello and Plass 2001). Auch für die Hemmung der Ausbreitung von viralen Transposons ist dieser Mechanismus von Bedeutung (Bestor 1998). Bei der genomischen Prägung werden DNS-Methylierungsmuster vererbt. Dabei werden Gene, je nachdem ob sie aus dem Erbgut des Vaters oder der Mutter stammen, in der Keimbahn markiert. In Abhängigkeit vom paternalen oder maternalen Ursprung eines Gens kann seine Transkription durch Methylierung während der Embryonalentwicklung inhibiert werden.



Möglicherweise wird durch die DNS-Methylierung die Bindung der Transkriptionsfaktoren an ihre Erkennungssequenz erschwert und dadurch die Genexpression gehemmt (Tate and Bird 1993). An der epigenetischen Regulation sind jedoch nicht nur chemische Modifikationen der DNS, sondern auch spezielle Proteine beteiligt. MeCP2 (Methyl-CpG Binding Protein 2), MBD1 (Methyl-CpG Binding Domain Protein 1) und MBD2 (Methyl-CpG Binding Domain Protein 2) z.B. binden speziell an methylierte DNS und reprimieren die Genexpression, indem sie die Promotorregion vor den Transkriptionsfaktoren abschirmen. Sie können Histon-Deacetylasen rekrutieren, was dazu führt, dass sich das Chromatin verdichtet und transkriptionell inaktiv wird (Razin 1998). Dabei ist MeCP2 an der X-Inaktivierung während der embryonalen Entwicklung beteiligt. HDAC1 und HDAC2 interagieren aber auch direkt mit den DNMTs (Fuks, Burgers et al. 2000) (Robertson 2002), was generell vermuten lässt, dass die epigenetischen Regulationsmechanismen miteinander verknüpft sind (Bachman, Park et al. 2003).

### **1.2.3 DNS-Methylierung und Krebs**

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass an der Entwicklung einer Krebserkrankung und dem Ansprechen auf eine Chemotherapie nicht nur genetische, sondern auch epigenetische Aberrationen beteiligt sind (Shen, Kondo et al. 2007). Sie können zu unreguliertem Zellwachstum führen, indem sie den Krebszellen durch die transkriptionelle Repression von Tumorsuppressorgen durch Hypermethylierung einen Überlebensvorteil verschaffen. Die transkriptionelle Ausschaltung eines Gens kann dabei auf einer Kombination aus epigenetischer Regulation und Mutation oder Deletion beruhen, wie z.B. beim Tumorsuppressorgen p16 (Merlo, Herman et al. 1995) (Aktas, Celebiler et al.). Ein verminderter Methylcytosinegehalt, der häufig in repetitiven Sequenzen in Krebszellen gemessen wird, wird ebenfalls mit der Entstehung und Progression der Erkrankung in Verbindung gebracht. Die Hypomethylierung kann genomische Instabilitäten hervorrufen (Feinberg and Vogelstein 1983) (Ehrlich 2002) oder Protoonkogene, wie z.B. c-Myc in kolorektalen Karzinomen aktivieren (Sharrard, Royds et al. 1992). (Chekhun, Kulik et al. 2006) zeigten einen Zusammenhang zwischen der Hypomethylierung eines Gens und der Entwicklung der Therapieresistenz, indem sie nachwiesen, dass in Doxorubicin-resistenten MCF-7 Zellen im Vergleich zu

sensitiven Zellen das Resistenzgen MDR1 hypomethyliert vorliegt und überexprimiert wird.

In Neuroblastomen liegt Caspase 8, ein Schlüsselenzym der Apoptose, häufig hypermethyliert vor (Eggert, Grotzer et al. 2001) (Teitz, Lahti et al. 2001). Dies geht mit einer schlechten Prognose einher (Hoebeeck, Michels et al. 2009). Weitere Gene, die durch die Methylierung ihrer Promotorregion mit der Entstehung oder Progression des Neuroblastoms assoziiert sind, sind z.B. das Tumorsuppressorgen RASSF1A (Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1) und der Transkriptionsfaktor HOXA9 (Homeobox A 9). Es wurde nachgewiesen, dass sie auch in anderen Tumoren hypermethyliert sind, was mit einer schlechten Überlebensrate einhergeht und im Neuroblastom als prognostischer Marker verwendet werden könnte (Alaminos, Davalos et al. 2004) (Ebinger, Senf et al. 2004) (Misawa, Tanaka et al. 2009). Die derzeit identifizierten Gene, die in Tumoren, jedoch nicht in gesundem Gewebe epigenetisch reprimiert sind, haben vielfältige Funktionen, wie die Zellzyklusregulation, Zelldifferenzierung und Apoptose (Cheung, Lee et al. 2009). Da sie häufig in Erkrankungen mit schlechter Prognose und Therapieresistenz abweichend methyliert sind, gilt die epigenetische Regulation auch als beteiligter Mechanismus der Resistenzentwicklung.

Therapeutische Ansätze zur DNS-Demethylierung werden derzeit präklinisch und klinisch getestet und angewandt. Dazu zählen u.a. die Behandlung mit 5-Aza-cytidin (Vidaza®) oder 5-Aza-2'-deoxycytidin (Decitabine, Dacogen®). Diese Wirkstoffe hemmen die Aktivität der DNMTs, verursachen so eine Demethylierung der DNS und verlangsamen die Zellproliferation oder führen zum Zelltod (Luczak and Jagodzinski 2006; Jabbour, Issa et al. 2008). Durch ihre unspezifische Wirkung in Form einer genomweiten Demethylierung gehen sie jedoch mit starken Nebenwirkungen wie Neutropenie oder Thrombozytopenie einher (Esteller 2005). Deshalb ist es essentiell, die molekularen Faktoren, die an der Entstehung und Progression von Krebs beteiligt sind, aufzudecken und neue, zielgerichtete Therapieansätze zu entwickeln.

### **1.3 DMH als Methode zur Identifizierung resistenzassoziierter Faktoren**

Die Differential Methylation Hybridisation (DMH) ist ein arraybasiertes Verfahren zur Analyse der differentiellen Methylierung resistenzassoziierter Faktoren. Dieses Hochdurchsatzverfahren ermöglicht den genomweiten Vergleich der DNS-Methylierungsmuster. Daher scheint es ideal zur Identifizierung neuer Zielgene für de novo Methylierungen. Die Validierung der als abweichend methyliert identifizierten Gene kann z.B. durch Bisulfit-Sequenzierung zur detaillierten Analyse des Methylierungsgrades der einzelnen CpGs einer CpG-Insel (vgl. 3.2.17), COBRA (Combined Bisulfit Restriction Analysis) -einer Kombination aus Bisulfit-Modifikation und Restriktionsanalyse bestimmter CpGs (s. 3.2.18)- oder Reexpressionsanalyse nach DNS-Demethylierung (vgl. 3.2.19) erfolgen. In dieser Arbeit wurde die DMH-Methode genutzt, um Methylierungsdifferenzen zwischen chemotherapieresistenten Neuroblastomzellen und den sensitiven Parentalzellen zweier Zelllinien zu analysieren. Dabei wurden 16000 CpG-reiche Fragmente miteinander verglichen. Die Analysen wurden in Kooperation mit Andreas Waha aus der Cancer Epigenetics Group am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. Die Methode basiert auf der Hybridisierung der Proben-DNS mit CpG-angereicherten DNS-Sequenzen auf dem Microarray (Yan, Chen et al. 2002). Diese Sonden stammten ursprünglich aus der CpG-Insel Bibliothek des UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Hinxton, Cambridge.

## **2 Ziele der aktuellen Studie**

In dieser Studie sollten epigenetische Aberrationen identifiziert werden, die an der Progression und Resistenzentwicklung von Neuroblastomen beteiligt sind. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen die molekularen Mechanismen, die für die Entstehung einer Therapieresistenz verantwortlich sind, besser zu verstehen und gezielter behandeln zu können. Dies soll langfristig dazu beitragen die Überlebensraten von Hochrisikopatienten zu verbessern. Dabei sollte vor allem das Hochdurchsatzverfahren der DMH-Analyse genutzt werden, um folgende Forschungsfragen zu beantworten:

Welche Differenzen gibt es im DNS-Methylierungsmuster von Neuroblastomzellen, die gegen in der Neuroblastomtherapie häufig eingesetzte Zytostatika resistent gezüchtet wurden, versus sensitiven Neuroblastomzellen im präklinischen Modell?

Ist die DMH-Analyse eine geeignete Methode, um aberrant de novo methylierte Gene oder hypomethylierte Gene in resistenten Zellen zu identifizieren?

Sind die identifizierten epigenetischen Veränderungen relevant für die Entwicklung einer Therapieresistenz?

Korrelieren die epigenetischen Aberrationen mit Veränderungen der Expression der Kandidatengene in resistenten versus sensitiven Zelllinien, sowie in primären Neuroblastomen mit günstiger versus schlechter Prognose?

Welche Funktionen erfüllen die Zielgene?

Existieren Interaktionen zwischen den epigenetisch regulierten Kandidatengenen und anderen resistenzassoziierten Faktoren oder/und leisten sie einen Beitrag zur Resistenzentwicklung gegen weitere ausgewählte Zytostatika?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

5-Aza-2'-deoxycytidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumin, bovine serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Alexa 488 Negativ Control	Qiagen, Hilden
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Bacto Trypton	BD, Heidelberg
BenchMark Protein Marker	Invitrogen, Karlsruhe
Bradford Reagenz	Roth, Karlsruhe/ BioRad
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cisplatin 0,5 mg/ml	Medac, Wedel
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Cy3, Cy5	GE Healthcare, München
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTP-Mix	Bio-Budget, Krefeld
Doxorubicin	cell pharm, Bad Vilbel
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL plus Western-Blotting Detection System	GE Healthcare, München
Etoposid	Pharmachemie B.V., Haarlem, Niederlande
Foetal Bovine Serum (FBS) Gold	PAA Laboratories, Cölbe
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gentamycin 40 Hexal SF	Hexal, Holzkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefe Extrakt	BD, Heidelberg
HiPerfect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Hygromycin B 50 mg/ml	Invitrogen, Carlsbad, USA

Irinotecan	Pfizer Pharma, Berlin
Längenmarker 1 kb	Fermentas, St. Leon-Rot
Längenmarker 100 bp	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Milchpulver Blotting Grade	Roth Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Hoechst, Frankfurt am Main
MTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
O6-Benzylguanin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Opti-MEM I Reduced-Serum Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd 4%ig	Morphisto, Frankfurt am Main
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Propidium Iodid 95%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	GE Healthcare, München
Random Primers	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RPMI1640	Invitrogen, Karlsruhe
SDS 4x	Gerbü, Gaiberg
Select Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Spermidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
SRB	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptavidin Biotin HRP Komplex	Amersham, Buckinghamshire, UK
Sucrose	ICN-LabSolutions, Northeim
Temozolomid	Biozol, Eching
Tris	Roth, Karlsruhe
Trizol Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin Inhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Wasser für Injektionszwecke	Braun Melsungen, Melsungen

X-Gal	Sigma-Aldrich, Steinheim
ZFP37 siRNS	Qiagen, Hilden

Allgemein gebräuchliche Chemikalien	Merck, Darmstadt
	Roth, Karlsruhe
	Sigma-Aldrich, Seelze

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

12 well Zellkultur Platten	TPP Trasadingen, Schweiz
6 und 96 well Zellkultur Platten	Costar N.Y., USA
Combitips 5,0 ml	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
PCR Tubes	Peqlab, Erlangen
Pipette 2 ml, steril	Greiner, Frickenhausen
Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml, steril	Costar N.Y., USA
PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Safe lock tubes 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde

### 3.1.3 Zelllinien und Organismen

Kelly	DSMZ, Braunschweig
LAN1	Zur Verfügung gestellt von Dr. Robert C. Seeger (University of Southern California, Los Angeles, CA)
E. coli DH5 alpha Competent Cells	Invitrogen, Karlsruhe
E. coli TOP10	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.4 Primer und Oligonukleotide

Primer	sense	antisense	AT [°C].
CD44	gatggagaaagctctgagcatc	tttgctccaccttcttgactcc	60,3
GAPDH	ccacccatggcaaattccatggca	tctagacggcaggtcaggtccacc	61
GAPDH-RT	catcaagaaggtggtgaagc	gagcttgacaaagtggctgt	60
H-12	taatccctcgga		65
H-24	aggcaactgtgctatccgagggat		65
IGSF4-BS	gtgagtgcggaaattgtaattgttggt	aatctaacttctatacacctttattaaaa	59
M13	gtaaaacgcagcgccag	caggaaacagctatgac	
pBD631	caggaagatggctgtgag		
ZFP37	aaggcaaaaagcaaactgga	ggctgggtgatttctcatgt	55,3
ZFP37 CGI-1	gtttggaggagttaaagtat	ccaactaccaataaaccaaaa	58
ZFP37 CGI-2	ttgatattttaagttaaattattaatttt	aaattctaacaaaacccaaaacc	56
ZFP37 CGI-3	tggagagaatagaatagttttttt	aactacaaataccaccaccac	56
ZFP37-BS	gggttgtaggttaggttagt	ctctaactttatcaaaatctaa	54

BS = Primer für bisulfitmodifizierte DNS, RT = Primer für die Real-Time PCR

Die Primer stammten von MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland.

(AT = Annealingtemperatur)

Gen	TaqMan Assays
ZFP37	Hs00185659
ABCC4	Hs00988734
MGMT	Hs00172470

Die Assays on Demand für die Real-Time PCR stammten von Applied Biosystems, Carlstown, USA.

### 3.1.5 Antikörper und Enzyme

Maus-Anti-ZFP37, 611968	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Maus-Anti-β-Aktin, A5441	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Kaninchen-Anti-Histon H3, 9715	Cell Signaling, Danvers, USA



Maus-Anti-MDR1, MC-012	Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA
Ziege-Anti-Maus, biotinyliert, E0433	Dako, Hamburg
Ziege-Anti-Kaninchen, biotinyliert, E0432	Dako, Hamburg
Esel-Anti-Maus IgG, Cy <sup>TM</sup> 5-markiert, 715-176-150	Jackson ImmunoResearch Inc., Suffolk, UK
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K 20.000 U/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ribonuclease H	TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
RNase OUT	Invitrogen, Carlsbad, USA
Taq DNA Polymerase	GE Healthcare, München
Die Enzyme BglII, BstUI, EcoRI, HindIII, HpaII, MseI, T4 DNA-Ligase und TaqI stammten von New England BioLabs, Hitchin, UK.	

### 3.1.6 Kits

E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
EpiTect Bisulfit Kit	Qiagen, Hilden
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
PCR purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen RNeasy Micro und Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript <sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA
SYBR-Green PCR Mastermix	Applied Biosystems, Carlstown, USA
TOPO TA Cloning Kit with pCR 2.1-TOPO	Invitrogen, Carlsbad, USA
Universal Microarray Validation Kit	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

### 3.1.7 Lösungen und Puffer

#### Lösungen für den MTT-Test

MTT-Lösung	5 mg MTT in 50 ml PBS
------------	-----------------------

10 g SDS; 100 ml DMSO; 0,6 ml Eisessig

DNS-Isolationspuffer	75 mM-NaCl; 24 mM Na <sub>2</sub> EDTA; 0,1 % SDS; deionisiertes Wasser
TE-Puffer	10 ml Tris-HCl 1M (pH 7,4 /7,6 /8,0), 2 ml Na <sub>2</sub> - EDTA 0,5 M (pH 8,0), aqua bidestillata auf 1000,0 ml

50x TAE	108,0 g Tris-HCl, 15,1 ml H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%, 40,0 ml Na <sub>2</sub> -EDTA 0,5M
Ladepuffer für DNS-Gele	5,0 ml Glycerin, 0,05 g Bromphenolblau, 0,05 g Xylencyanol, 5xTBE auf 10,0 ml

RIPA Puffer	50 mM TRIS-HCl pH 7,4, 1% NP-40, 0,25% Na-Desoxycholat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS
KE (Kernextrakt) Puffer A	10 mM Natrium-HEPES, 0,5 mM Spermidin, 0,15 mM Spermin, 1 mM EDTA, 0,25 mM EGTA, 0,5 M Saccharose, 50 mM NaCl, pH 7,9, Zugabe des Complete Proteaseinhibitors (Roche) kurz vor Verwendung des Puffers
KE Puffer B	10 mM Natrium-HEPES, 0,5 mM Spermidin, 0,15 mM Spermin, 1 mM EDTA, 0,25 mM EGTA, 0,35 M Saccharose, 50 mM NaCl, pH 7,9, Zugabe des Complete Proteaseinhibitors (Roche) kurz vor Verwendung des Puffers
KE Puffer C	10 mM Natrium-HEPES, 0,5 mM Spermidin, 0,15 mM Spermin, 1 mM EDTA, 0,25 mM EGTA, 0,50 mM Saccharose, 420 mM NaCl, pH

	7,9, Zugabe des Complete Proteaseinhibitors (Roche) kurz vor Verwendung des Puffers
20x MOPS SDS Laufpuffer	104,6 g MOPS (3-(N-morpholino)propan-sulfonsäure), 60,6 g Tris Base, 10 g SDS, 3 g EDTA, gereinigtes Wasser auf 500 ml
4x NuPAGE LDS Ladepuffer	0,666 g TRIS-HCl, 0,682 g TRIS-Base, 0,8 g Lithium Dodecyl Sulfat, 0,006 g EDTA, 4,0 g Glycerin, 0,75 ml Coomassie Blue G250 1%, 0,25 ml Phenolrot 1%, deionisiertes Wasser auf 10,0 ml
Coomassie-Färbelösung	2,5 g Coomassie R-250, 200 ml Methanol, 50 ml Essigsäure, deionisiertes Wasser auf 500 ml
Fast Green-Färbelösung	0,5 g Fast Green FCF, 100 ml Methanol, 50 ml Essigsäure, deionisiertes Wasser auf 500 ml
10x Transferpuffer	30,3 g Tris Base, 144 g Glycin, deionisiertes Wasser auf 1000 ml
PBST	0,02% Tween in PBS
Blockierungslösung	5% Milchpulver in PBST

### **Lösungen für die Immunfluoreszenz-Analyse**

Mowiolösung zum Eindecken	2,4 g Mowiol (Hoechst), 6 g Glycerin, 6 g deionisiertes Wasser, 12 ml Tris/HCl 0,2 M pH 8,5
---------------------------	---

### **Lösungen für die Transformationsreaktion**

LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, deionisiertes Wasser auf 1 l, pH 7,5
LB-Platten	2 % Select-Agar in LB-Nährmedium

### **Lösungen für die Durchflußzytometer-Analyse**

Propidiumiodidlösung 1 mg/ml	10 µg Propidiumiodid, 100 µl TRIS-HCl 1 M pH 8, 20 µl NaCl 5 M, 1 ml Triton X-100 10%,
------------------------------	--

100 µl Rnase A 10 mg/ml, deionisiertes Wasser  
auf 100 ml

### 3.1.8 Geräte

Gene Amp® 5700 Detection System	Applied Biosystems, Carlstown, USA
Beckman Epics XL FACS	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Biodoc	UVP, Upland, CA, USA
Coulter Counter	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Gene Amp® 5700 Detection System	Applied Biosystems, Carlstown, USA
Rotixa 50S	Hettich, Mülheim an der Ruhr
T-Gradient Thermo Cycler	Biometra, Göttingen
Nanodrop	NanoDrop products, Wilmington, USA
Schüttelinkubator Certomat	B. Braun Biotech International, Melsungen
Zentrifuge Allegra X-22R	Beckman Coulter, Fullerton, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von Neuroblastomzelllinien

Die humanen Neuroblastomzelllinien wurden bei 37°C, 80 % Luftfeuchtigkeit und in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gezüchtet. Das Kulturmedium bestand aus RPMI 1640 mit 10 % fetalem Rinderserum (FBS Gold, Fa. PAA Laboratories, Cölbe) mit Penicillin-Streptomycin (100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) oder Gentamycin (50 µg/ml) im Wechsel zur Vermeidung von Resistenzen. Die Zellen wurden in sterilen Zellkulturflaschen mit 25 oder 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche gezüchtet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Zum Passagieren der adhärent wachsenden Zellen wurden 2 ml Trypsin/EDTA verwendet, um die Zellen von den Kulturflaschen abzulösen. Die von Frau Dr. Kristina Ehleben in ihrer Doktorarbeit durch Langzeitkultur mit steigenden Zytostatikadosen resistent gezüchteten Zellen wurden mit ihren jeweiligen Resistenzerhaltungsdosen des Zytostatikums inkubiert: Die Konzentration des Zytostatikums pro ml Medium entsprach für LAN1 Zellen 0,15 µg/ml Doxorubicin, 0,54

µg/ml Etoposid oder 0,68 µg/ml Cisplatin und für Kelly Zellen 0,32 µg/ml Doxorubicin, 1 µg/ml Etoposid oder 1 µg/ml Cisplatin.

Die LAN1 (Los Angeles Neuroblastoma 1) Zelllinie entstand 1977 aus dem Knochenmark eines zweijährigen Jungen, der an einem Neuroblastom des Stadiums 4 erkrankt war (Seeger, Rayner et al. 1977). Die humane Zelllinie KELLY (DSMZ, Braunschweig) stammt ebenfalls aus einem Patienten mit Neuroblastom (Schwab, Alitalo et al. 1983). Sowohl die LAN1 als auch die Kelly Zelllinie zeigen eine ca. 100fache N-Myc Amplifikation.

### **3.2.2 Zytotoxizitätstest und Resistenzfaktorbestimmung**

Die Zytotoxizität der einzelnen Zytostatika wurde *in vitro* mit Hilfe des MTT-Tests oder SRB-Tests bestimmt. Mit dem MTT-Test wurde die metabolische Aktivität vitaler Zellen anhand ihrer Fähigkeit, den gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in den Mitochondrien zu violetter Formazan reduzieren zu können, quantifiziert (Mosmann 1983). Die Zellen wurden hierzu auf 96-Well-Platten verteilt. Nach 24 Stunden, in denen die Zellen adhären wurden, wurde das Zytostatikum in unterschiedlichen Verdünnungen zugegeben und für weitere 72 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde MTT-Lösung in einer Endkonzentration von 0,8 mg/ml Medium zugegeben und für vier Stunden auf den Zellen belassen. Danach wurde das MTT-Medium entfernt und die Zellen mit 100 µl Solubilisierungslösung unter vorsichtigem Schütteln lysiert, bis die Lösung gleichmäßig violett gefärbt war. Die Absorption des entstandenen Formazans wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt.

Für den SRB (Sulforhodamin B)- Test nach (Skehan, Storeng et al. 1990) wurden die Zellen für 24 Stunden mit dem Zytostatikum inkubiert, bevor das Medium gewechselt wurde. Die Zellen wurden für weitere 72 Stunden ohne Zytostatikum wachsen gelassen. Dann wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 50 µl Trichloressigsäure 10% bei 4°C in 2 Stunden fixiert. Nachdem sie zweimal mit PBS gewaschen wurden, wurden die von den Zellen gebildeten Proteine mit 50 µl SRB 0,4% in Essigsäure 1% in 30 Minuten bei RT gefärbt. Ungebundener Farbstoff wurde zweimal mit Essigsäure 1% abgewaschen. Durch die Zugabe von 150 µl 10mM Tris pH 10,5 wurde der

proteingebundene Farbstoff unter Schütteln extrahiert. Die spektrophotometrische Messung erfolgte ebenfalls bei 570 nm.

Die im ELISA-Reader gemessene Absorption ist direkt proportional zur intakten Zellfunktion und der Anzahl lebender Zellen. Die Ergebnisse wurden als Vitalität der Zellen in % bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten Zytostatikums dargestellt.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde für alle Zelllinien die  $IC_{50}$  bestimmt. Die  $IC_{50}$ -Dosis eines Zytostatikums ist die Konzentration, bei der nach einmaliger Gabe 50 % der Zellen im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Zytostatikum abgetötet werden.

Der Resistenzfaktor beschreibt das Verhältnis der  $IC_{50}$ -Dosis der resistenten Sublinie zu der  $IC_{50}$ -Dosis des sensitiven Wildtyps. Er wurde bestimmt, indem die  $IC_{50}$ -Dosis der resistenten Sublinie durch die des Wildtyps dividiert wurde.

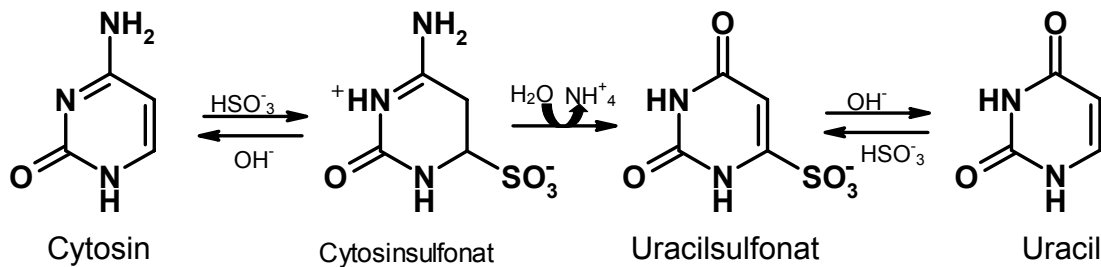
### **3.2.3 Isolierung genomischer DNS**

Die Zellen wurden durch Trypsin-Behandlung und Zentrifugieren gesammelt und mit PBS gewaschen. Über Nacht wurden sie bei 50°C in DNS-Isolationspuffer (s. 3.1.7) mit 5 % Proteinase K inkubiert, um die Zellen unter Verwendung von SDS und EDTA zu lysieren und die Proteine abzubauen. Durch anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die Proteinfraction von der DNS getrennt. Dazu wurde die Probe mit 250 µl Chloroform-Isoamylalkohol und 250 µl Phenol gemischt und bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Minuten zentrifugiert. Der wässrige Überstand mit der DNS wurde abgenommen und erneut mit Phenol-Chloroform extrahiert. Um Phenolreste zu entfernen, wurde anschließend zweimal mit 500 µl Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Die genomische DNS in wässriger Lösung wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M-Natriumacetatlösung bei Raumtemperatur gefällt, bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer gelöst. Die DNS-Konzentration wurde mit Hilfe des Nanodrop Spektrophotometers bestimmt.

### **3.2.4 Bisulfit-Modifikation genomischer DNS**

Viele Analysen des Methylierungsmusters der DNS beruhen auf der Bisulfit-Modifikation von genomischer DNS. Durch die Bisulfit-Behandlung wird der Unterschied zwischen

unmethyliertem Cytosin und 5-Methylcytosin analysierbar, indem unmethyliertes Cytosin zu Uracil desaminiert wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt. Das C5-Atom des Cytosins reagiert mit dem Bisulfition aus Natriumbisulfit zu Cytosinsulfonat. Daraus entsteht in wässriger Lösung durch Desaminierung sulfoniertes Uracil. Unter alkalischen Bedingungen wird die Sulfongruppe abgespalten und Uracil entsteht (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Chemischer Ablauf der Bisulfit-induzierten Desaminierung von Cytosin zu Uracil: Sulfonierung, hydrolytische Desaminierung, Desulfonierung**

Da Natriumbisulfit nur sehr selten mit methyliertem Cytosin reagiert, wird generell nur nicht methyliertes Cytosin zu Uracil umgewandelt. Die Modifikation funktioniert nur mit einzelsträngiger DNS, da das C6-Atom des Pyrimidinrings in doppelsträngiger DNS sterisch abgeschirmt ist. Nach der Bisulfit-Behandlung sind die beiden DNS-Einzelstränge nicht mehr komplementär. Bei einer anschließenden Synthese eines komplementären Doppelstranges bewirkt der Uracil-Rest den Einbau eines Adenins, so dass es zu einem Austausch eines GC-Basenpaares durch ein AT-Basenpaar kommt. 5-Methylcytosin bleibt in der Basenfolge erhalten, während die nicht methylierten Cytosine durch Thymin ersetzt werden.

Die Bisulfit-Modifikation wurde mit 2  $\mu\text{g}$  genomischer DNS und dem EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) laut Protokoll durchgeführt. Die Bisulfit-DNS wurde als Ausgangsmaterial für die Bisulfit-Sequenzierung und COBRA verwendet.

### 3.2.5 Isolierung von RNS

Um aus den Zellen RNS zu isolieren, wurde der RNeasy Reagenziensatz (Qiagen) laut Protokoll des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden lysiert und das homogenisierte Lysat aufgereinigt, indem es über eine spezielle RNS bindende Membran zentrifugiert wurde, wodurch DNS, Proteine und Salze durch verschiedene Waschschr

wurden. Die isolierte RNS wurde mit RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch mit Hilfe des Nanodrop Spektrophotometers bestimmt.

### **3.2.6 cDNS-Synthese aus isolierter RNS**

Das Umschreiben von RNS in cDNS erfolgte mit dem SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) nach abgewandeltem Herstellerprotokoll. Pro Probenansatz wurden maximal 3 µg RNS mit 1 µl 0,1 M dNTPs und 3 µl Random Primer gemischt. Nachdem für 5 Minuten bei 65°C denaturiert wurde, wurden 5 µl 5x RT-Puffer, 5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl 0,1 M DTT, 1,25 µl RNase-Inhibitor RNase-Out (40U/µl) und 1,25 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200U/µl) hinzugegeben. Diese Reaktion wurde 10 Minuten bei 25°C inkubiert, dann zur Elongation der cDNS 50 Minuten bei 42°C. Anschließend wurde die reverse Transkriptase für 15 Minuten bei 70°C inaktiviert. Zur cDNS komplementäre RNS-Reste wurden durch RNase H bei 37°C für 20 Minuten verdaut. Der Reaktionsansatz konnte direkt für eine PCR-Analyse verwendet werden.

### **3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion können definierte DNS- oder cDNS-Fragmente exponentiell amplifiziert werden. Für einen Reaktionsansatz wurden 50 - 250 ng Matrizen-DNS mit 2 µl 10x PCR Puffer, 0,565 µl 10 mM dNTPs, je 1 µl 20 pmol Primer sowie für eine semiquantitative PCR zusätzlich GAPDH Primer, 0,13 µl Taq DNA Polymerase und Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermo Cycler mit folgenden Parametern inkubiert: Denaturierung der DNS-Matrize bei 94°C für 5 Minuten, dann 28 - 30 Zyklen der Denaturierung für 45 Sekunden, Anlagerung der Primer bei ihrer jeweiligen optimalen Anlagerungstemperatur -abhängig von Länge und Basenfolge- für 30 Sekunden, Elongation bei 72°C für 30 Sekunden und abschließend 72°C für 10 Minuten.

Hiervon abweichend wurde für die PCR-Amplifikation von Bisulfit modifizierter genomischer DNS (vgl. 3.2.4) Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) verwendet: 1 µl mit 100 ng Bisulfit-DNS wurde mit 2 µl 10xPCR Puffer, 0,8 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl dNTPs, je 1 µl Primer, 0,1 µl Polymerase (5 U/µl) und 13,7 µl Wasser gemischt. Die Denaturierung der DNS erfolgte bei 95°C für 10 Minuten, dann folgten 40 Zyklen bei



94°C für 45 Sekunden, 56°C für 45 Sekunden, 72°C für 45 Sekunden und die abschließende Elongation bei 72°C für 10 Minuten.

### **3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese**

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich DNS-Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe auftrennen. Abhängig von der Länge der DNS-Sequenzen wurde ein 0,8-, 2- oder 3%iges Gel angefertigt, indem die entsprechende Agarosemenge durch Erhitzen in der Mikrowelle in 1x TAE Puffer gelöst wurde. Um die DNS sichtbar machen zu können, wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Die Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen, aushärten gelassen und mit 1x TAE Puffer überschichtet. Die DNS-Proben wurden mit Ladepuffer gemischt und in die Gel-Taschen pipettiert. Bei einer angelegten Spannung von 120 Volt für 1 Stunde wanderten die DNS-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode und konnten durch UV Licht im Biodoc Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

### **3.2.9 Real-Time PCR**

Die Real-Time PCR ist eine sensitive Methode zur DNS-Amplifikation und Quantifizierung der synthetisierten DNS in Echtzeit. Gemessen wird ein Fluoreszenzsignal, das in der exponentiellen Phase der DNS-Vervielfältigung proportional zur DNS-Menge zunimmt.

Die Real-Time PCR wurde mit Hilfe des TaqMan<sup>™</sup> Gen-Expressionsassays der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Hierfür wurde eine Oligonukleotid-Sonde synthetisiert, die komplementär zu der zu analysierenden cDNS-Sequenz zwischen dem Primerpaar ist. Die Sonde ist am 5'-Ende mit dem fluoreszierenden Reporter Farbstoff FAM (6-carboxy-fluorescein) markiert, während das 3'-Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher sowie einen Phosphatrest trägt, der verhindert, dass das Oligonukleotid während der PCR verlängert werden kann. Der Quencher unterbindet durch seine räumliche Nähe zum FAM dessen Fluoreszenz durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer. Wenn die zu analysierende cDNS während der PCR denaturiert wird, lagert sich die Sonde an den komplementären Strang. Wenn dann die Taq-Polymerase aktiv wird und ausgehend vom Primer das PCR-Produkt synthetisiert, trifft sie auf die

Sonde und schneidet diese durch ihre 5'-3'-Exonuklease Aktivität. Hierdurch entfernen sich FAM und Quencher voneinander, die Fluoreszenz des FAM wird nicht mehr inhibiert und somit messbar. Die zunehmende Fluoreszenz wurde mit dem ABI TaqMan 5700 während jedes PCR-Zyklus gemessen. Der Ct-Wert (Cycle Threshold) markiert dabei die Zyklenzahl, bei der die detektierte Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Er kennzeichnet den Bereich, in dem die Amplifikation der DNS exponentiell verläuft. Für eine relative Quantifizierung wurde in dieser Arbeit GAPDH als Referenzgen bestimmt. Zunächst wurden für das interessierende Gen und das Referenzgen lineare Standardkurven mit Hilfe einer Kalibratorprobe erstellt. Dazu wurde für die Kalibrator-DNS eine Verdünnungsreihe in logarithmierten Stufen erstellt, die jeweiligen Ct-Werte bestimmt und gegen die logarithmierten Werte der eingesetzten cDNS aufgetragen. Für die Standardkurve gilt die Geradengleichung  $Ct = m \cdot x + b$ , womit sich die DNS-Konzentration in der Probe ermitteln lässt.

*m = Steigung*

*x = Logarithmus  $10^x$  der gesuchten DNS-Konzentration*

*b = Schnittpunkt mit der y-Achse*

Mit dieser Standardkurve können die Ct-Werte für interessierendes und Referenzgen in den folgenden Analysen mittels TaqMan Software in eine relative Mengenangabe bezogen auf die Kalibratorprobe umgerechnet werden. Nach der Delta-Ct-Methode ergibt der Quotient aus relativer Mengenangabe des interessierenden Gens und des Referenzgens die relative Expression des interessierenden Gens.

Der PCR-Ansatz für die interessierenden Gene bestand aus je 1 µl Assay on Demand Gene Expression Assay Mix der Firma Applied Biosystems, welcher die markierten Sonden und Primer enthält, gemischt mit 10 µl TaqMan Fast Universal PCR Master Mix und 9 µl cDNS, was 100 ng entsprach.

Der PCR-Ansatz für das GAPDH Referenzgen enthielt statt einer speziellen Sonde SYBR-Green, welches mit doppelsträngiger DNS interkaliert und dann das zu messende Fluoreszenzsignal emittiert. Der Ansatz bestand aus 10 µl SYBR-Green PCR Master Mix, je 1 µl GAPDHsense und GAPDHantisense Primer (5 pmol) und 8 µl cDNS (100 ng). Aufgrund der unterschiedlichen Chemie von TaqMan und SYBR-Green basierter Real-Time PCR unterschied sich die Dauer der Inkubationsschritte der PCR wie folgt (Tabelle 2, Seite 43):

**Tabelle 2: Inkubationstemperatur und –dauer der TaqMan (interessierendes Gen) und SYBR-Green basierten (Referenzgen) Real-Time PCR**

Temperatur [°C]	Interessierendes Gen	Referenzgen
95	20 Sek.	10 Min.
95	1 Sek.	15 Sek.
60	20 Sek.	1 Min.

Die PCRs wurden als Triplikat mit 40 Zyklen durchgeführt.

### **3.2.10 Genexpressionschip-Analyse in primären Tumoren**

Mit Hilfe der Genexpressionschip- oder Microarray-Methode ist es möglich, den Expressionsgrad vieler Gene simultan zu bestimmen und in unterschiedlichen Proben zu vergleichen. Der Chip ist mit Nukleotidsonden bestückt, mit denen fluorezenzmarkierte Nukleinsäuren aus den zu analysierenden Proben hybridisieren können, wenn die entsprechenden Gene exprimiert wurden. Nicht hybridisierte Nukleotide aus den Zellen werden durch Waschen entfernt, so dass nur das Fluoreszenzsignal der exprimierten und gebundenen Sequenzen gemessen wird.

Zur Expressionsanalyse von Neuroblastomen aus 68 Patienten wurde der HG-U95Av2 Microarray der Firma Affymetrix verwendet (Schramm, Schulte et al. 2005). Die RNS Isolation aus den Tumorproben erfolgte wie in dieser Arbeit beschrieben. Die Umschreibung in biotinmarkierte cRNS, ihre Fragmentierung, Hybridisierung mit den Chipsonden, das Waschen, Färben und Scannen des Microarrays mit dem GeneArray scanner (Agilent, Palo Alto, CA, USA) erfolgte wie in (Schulte, Schramm et al. 2003) beschrieben.

Die Daten der Expressionsanalyse wurden mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite Software und dem Statistikprogramm R2.4 (r-project.org) ausgewertet. Korrelationsanalysen wurden unter Verwendung der nicht-öffentlichen R2-Micorarrayanalyseplattform durchgeführt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. R. Versteeg, Abteilung Humangenetik des AMC Amsterdam).

### **3.2.11 Isolierung von Gesamtproteinextrakten**

Zur Herstellung der Proteinextrakte wurden die Zellen zunächst dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte mit kaltem RIPA Puffer, dem vor der

Verwendung Protease Inhibitoren (Roche Complete<sup>®</sup>) zugesetzt wurden. Der Lysepuffer wurde zu den Zellen gegeben (maximal 500 µl für eine konfluent bewachsene 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche), durch Schwenken gründlich verteilt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde dann mit einem Gummispatel vorsichtig zusammengekratzt und in ein Eppendorf Tube überführt. Bei maximaler Geschwindigkeit wurde für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand mit den Proteinen weiterverwendet oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **3.2.12 Isolierung von cytosolischen Proteinextrakten und Kernextrakten**

Konfluent gewachsene Zellen wurden dreimal auf Eis mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 10 ml PBS auf Eis mit einem Gummispatel abgeschabt. Die Zellen wurden für 4 Minuten bei 1200 U/min und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 500 µl KE (Kernextrakt) Puffer A (s. 3.1.7) für etwa 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Mikroskop wurde das Aufplatzen der Zellmembranen kontrolliert. Bei 4°C und 2400 U/min wurde in 10 Minuten der Überstand mit den cytosolischen Proteinen abzentrifugiert und abgenommen. Das verbleibende Pellet wurde dreimal in je 15 ml KE Puffer B gewaschen, bis im Mikroskop keine Membranreste oder andere Zelltrümmer mehr erkennbar waren. Die Zellkerne wurden in 200 µl KE Puffer C auf Eis unter Verwendung eines Magnetrührers zum Platzen gebracht. Nach Zentrifugieren bei 13000 U/min für 45 Minuten bei 4°C wurde der Überstand mit den Kernproteinen abgenommen.

### **3.2.13 Quantitative Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bradford-Test. Der rote Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau bildet mit Proteinen blaugefärbte Komplexe, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschiebt. Eine Eichkurve wurde mit BSA in Konzentrationen von 0 bis 10 µg/ml erstellt, indem die entsprechende Menge BSA in 200 µl Bradford Lösung und 800 µl Puffer gelöst wurde. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zellextrakten wurden entsprechend 5 µl Lysat mit 795 µl Puffer und 200 µl Bradford Reagenz gemischt. Nach der photometrischen Messung mit dem Nanodrop Spektrophotometer wurde über die

Korrelation mit den Werten der Eichkurve die Proteinmenge und Konzentration in den Zelllysaten bestimmt.

#### **3.2.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)**

Für die SDS-PAGE wurden 20 µg Protein in 20 µl Puffer mit 5 µl Ladepuffer versetzt und 5 Minuten lang bei 95°C denaturiert. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer gesetzt, welche zwischen den Gelen und außerhalb mit 1x MOPS SDS Laufpuffer (s. 3.1.7) befüllt wurde. Nachdem die Taschen mit dem Marker und den Proben beladen wurden, wurden die Proteine bei 120 V und 120 mA für 70 Minuten aufgetrennt.

#### **3.2.15 Western-Blot und Detektion von Proteinen auf Membranen**

Zur Überführung der in der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein Western-Blot durchgeführt. Das Gel wurde aus der Gelapparatur der Elektrophoresekammer entnommen, die Gelränder entfernt und das Gel in 1x Transferpuffer (s. 3.1.7) zwischengelagert. In dieser Zeit wurden die zurechtgeschnittene Membran, zwei Whatman-Papiere und zwei Schwämmchen mit Transferpuffer getränkt. Die Pufferkammer wurde für den Transfer mit 1x Transferpuffer gefüllt. Das Gel wurde zwischen zwei Elektroden mit Hilfe der Schwämmchen und Whatman-Papiere in direkten Kontakt mit der Membran gebracht. Bei einer für eine Stunde angelegten Spannung von 40 V und 150 mA wanderten die SDS-beladenen Proteine Richtung Anode auf die Membran. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran mit Fast-Green und das Gel mit Coomassie-Blau Färbelösung angefärbt. Nach der Entfärbung der Nitrozellulosemembran mit PBS wurde sie zur Western-Blot Detektion verwendet. Dazu wurde die Membran zunächst für zwei Stunden bei RT in 5%iger Milchlösung blockiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem in 5%iger Milchlösung entsprechend verdünnten Erstantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für 1, 5 und 20 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper für eine Stunde bei RT. Nach erneutem Waschen wurde für eine Stunde bei RT mit dem 1:1000 verdünnten Streptavidin-Biotin-HRP-Komplex inkubiert, für die Reaktion mit einem biotinylierten Anti-Kaninchen-Zweitantikörper wurde vorher 1:500 verdünnt. Dann wurde die Membran dreimal gewaschen, die restliche Waschlösung entfernt und die Membran für 5 Minuten mit ECL plus Detektionslösung

(GE Healthcare) inkubiert. Überschüssige Chemilumineszenz-Lösung wurde kurz abgetropft und die Membran zwischen zwei Prospekthüllen gelegt. In einer Dunkelkammer wurde ein Film aufgelegt und in einer lichtundurchlässigen Filmkassette abhängig von der Signalstärke inkubiert und der Film abschließend entwickelt.

### **3.2.16 Immunfluoreszenz-Analyse**

Die Zellen wurden hierfür auf autoklavierten Deckgläschen in 6-Well-Platten ausgesät und bis zur etwa 80 %igen Konfluenz wachsen gelassen. Vor der Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen mit Paraformaldehyd wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 4 %igem Paraformaldehyd für 10 Minuten bei RT. Durch dreimaliges Waschen der Zellen für 1, 2 und 5 Minuten mit PBST wurden die Zellmembranen permeabilisiert. Dann wurde für 30 Minuten in einer Lösung aus 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 mit 3% BSA und 20 % FBS (foetales Rinderserum) blockiert. Für den Nachweis von ZFP37 wurden die Zellen mit 100 µl des in PBS mit 0,1 % BSA verdünnten Antikörpers in einer feuchten Kammer bei RT für 60 Minuten inkubiert. Dann wurden sie dreimal in PBST für 1, 2 und 5 Minuten gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde Cy-5 markierter Anti-Maus-Antikörper verwendet: Die Zellen wurden mit 100 µl bei RT und unter Lichtschutz für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit Mowiol (s. 3.1.7) eingedeckt und das Deckgläschen mit den gefärbten Zellen auf Objektträgern fixiert.

Die Verteilung des ZFP37-Proteins in den Zellen verschiedener Sublinien wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops der Firma Leica Microsystems analysiert.

### **3.2.17 Bisulfit-Sequenzierung**

Die Sequenzierung der Bisulfit behandelten DNS ist eine geeignete Methode, um den Methylierungsstatus aller CpG-Dinukleotide einer bestimmten Genregion zu analysieren. Dazu wurde die zu untersuchende Sequenz mittels PCR aus der Bisulfit-DNS amplifiziert. Die Primer waren dabei so gewählt, dass sowohl methylierte als auch unmethylierte DNS amplifiziert wurde, das heißt sie waren zu einer DNS-Sequenz komplementär, die keine CpGs enthielt. Da nach einer Bisulfit-Modifikation die beiden DNS-Einzelstränge nicht mehr komplementär sind, mussten bei der Amplifikation der DNS die PCR-Primer strangspezifisch ausgewählt werden. Dieses Primerdesign

geschah unter Zuhilfenahme der methPrimerDB Datenbank (Li and Dahiya 2002). Die verwendeten Primer sind in 3.1.3 aufgeführt. Die Amplifikation des DNS-Fragments wurde mit Hilfe eines 2%igen Agarose-Gels kontrolliert. Die Klonierung des PCR-Produkts in einen Plasmid-Vektor und die Sequenzierung von Einzelklonen gibt Auskunft über das genaue Methylierungsmuster einzelner DNS Moleküle. 4 µl des PCR-Reaktionsansatzes wurden mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) laut Herstellerprotokoll in eine Klonierungsreaktion gegeben. Der linearisierte pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> Vektor trägt einen 3'-Deoxythymidin Überhang. Da die verwendete Taq Polymerase einen 3'-Deoxyadenosin Überhang an dem PCR-Produkt erzeugt, kann dieses effizient mit dem Vektor ligieren. 1 µl des Klonierungsansatzes wurde für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* DH5α verwendet (s. 3.2.22). Für eine Blauweißselektion wurden die Bakterien auf LB-Platten, denen 40 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) zugesetzt war, inkubiert. Der Einbau des PCR-Fragments in das Plasmid führte zu einer Insertionsinaktivierung des lacZ'-Gens mit Verlust der α-Komplementation der β-Galaktosidase. Die Kolonien mit Insert waren demnach weiß. Klone ohne Insert und intakter β-Galaktosidase hydrolysierten X-Gal zu Galactose und einem blauen Farbstoff. Es wurden mindestens 10 weiße Kolonien gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Plasmide unter Verwendung des E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (Pheqlab) nach Angaben des Herstellers isoliert. Um zu kontrollieren, dass das gewünschte Insert enthalten war, wurde ein Restriktionsverdau mit EcoRI durchgeführt. Dazu wurden 1 µg Plasmid-DNS mit 1 µl EcoRI und 2 µl 10x NEBuffer EcoRI Puffer in 20 µl Wasser für eine Stunde bei 37°C verdaut. Der Ansatz wurde mit einem 3%igen Agarosegel analysiert und insert-tragende Klone wurden unter Verwendung von M13-Oligonukleotiden (vgl. Vektorprimer 3.1.3) sequenziert (Fa. SeqLab, Göttingen). Um das Methylierungsmuster für die jeweilige Gensequenz aus resistenten und sensitiven Zelllinien oder aus Patientenproben bewerten zu können, wurden jeweils 10 Klone analysiert. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der BiQ Analyzer Software (Bock, Reither et al. 2005) qualitätskontrolliert. Die Konversionsrate von nicht methyliertem Cytosin in Uracil musste mindestens 90 % betragen. Dann wurde ausgewertet, wie viele Cytosine in CpG-Inseln der analysierten Sequenzen methyliert waren.

### 3.2.18 COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)

Die COBRA umfasst die PCR-Amplifikation der zu analysierenden DNS-Sequenz nach Bisulfit-Modifikation, gefolgt von einem Restriktionsverdau und anschließender Agarose-Gelelektrophorese zur Auswertung des Bandenmusters. Mit dieser Methode kann durch den Einsatz geeigneter Restriktionsenzyme untersucht werden, ob ein bestimmtes CpG-Dinukleotid methyliert ist. TaqI z.B. erkennt die Sequenz TCGA, welche bei Bisulfitbehandlung der DNS nur erhalten bleibt, wenn das CpG methyliert war. BstUI schneidet die Sequenz CGCG. Sind diese beiden CpGs nicht methyliert, verändert sich die Erkennungssequenz durch die Bisulfitmodifikation so, dass sie nicht mehr erkannt und die DNS folglich nicht verdaut wird. Das Verhältnis von verdautem zu ungeschnittenem PCR-Produkt spiegelt direkt den Methylierungsgrad des analysierten CpGs in der genomischen DNS wieder. Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie keine CpG Dinukleotide umspannten, so dass methylierte und unmethylierte DNS gleichermaßen amplifiziert wurde. Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der methPrimerDB Datenbank (Li and Dahiya 2002) erstellt. Die PCR-Amplifikation der Bisulfit-DNS erfolgte wie in 3.2.7 beschrieben. Für den Verdau des PCR-Produkts mit TaqI wurden 10 µl PCR-Produkt, 2 µl NEB3 Puffer, 0,2 µl BSA-Lösung, 1 µl Enzym (20U) und 6,8 µl Wasser gemischt. Nach einer Stunde Inkubation bei 65°C wurde der Ansatz auf einem 3%igen Agarose-Gel aufgetrennt und ausgewertet, ob ein Verdau stattgefunden hatte und die Probe folglich methyliert war. Der Verdau mit BstUI erfolgte bei 60°C für 16 Stunden. Der Reaktionsansatz bestand aus 10 µl PCR-Produkt, 2 µl NEB2 Puffer, 1 µl BstUI (20U) und 7 µl Wasser. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit einem 3%igen Agarose-Gel. Als Positivkontrolle wurde genomische DNS mit der CpG-Methylase SssI (New England Biolabs) und S-Adenosylmethionin (SAM) *in vitro* methyliert. Dazu wurden 500 ng DNS, 2 µl NEB2 Puffer, 1µl SAM und 0,5 µl SssI (4U/µl) in 17 µl Wasser für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Es wurden jeweils erneut 1 µl SAM und 0,5 µl SssI zugegeben, bevor für weitere zwei Stunden und dann 15 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Als Negativkontrolle wurde durch Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) demethylierte DNS verwendet (vgl. 3.2.19).



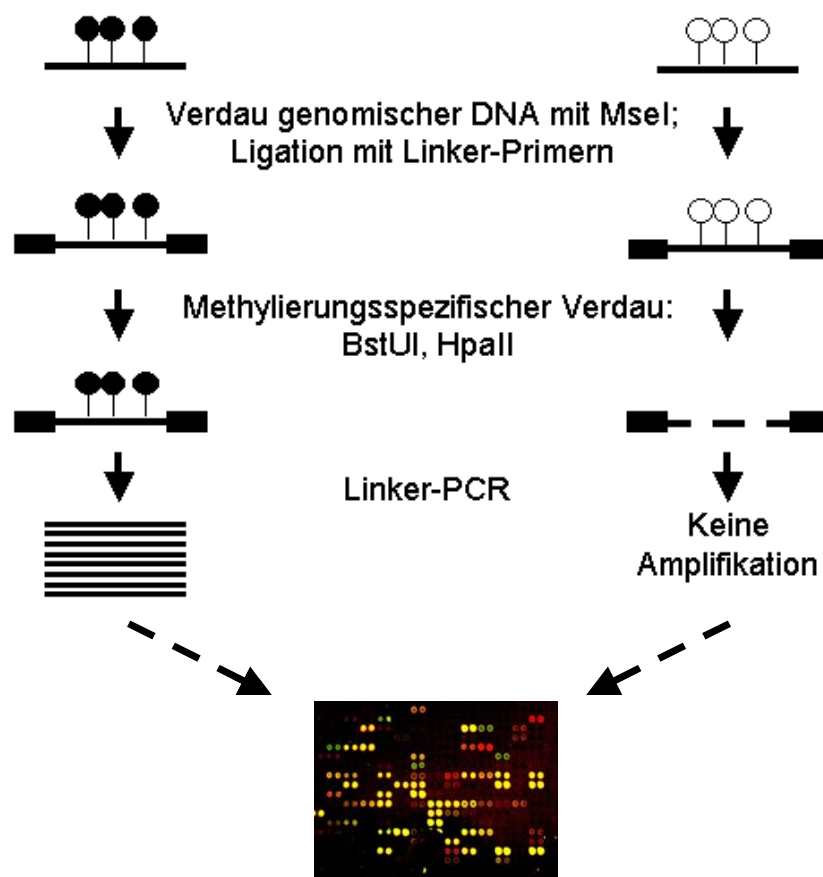
### 3.2.19 DNS-Demethylierung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Um zu überprüfen, ob die verminderte Expression eines Gens durch eine Hypermethylierung der DNS hervorgerufen wurde, wurden Zelllinien *in vitro* mit dem Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-Deoxycytidin inkubiert. Durch Vergleich der Genexpression in Zellen nach DNS-Demethylierung und in Kontrollzellen können Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen der Reexpression eines Gens und der Methylierung der DNS gezogen werden. Generell gilt die Annahme, dass die Expression eines Gens durch Methylierung der DNS unterdrückt wird. 5-Aza-2'-Deoxycytidin ist ein DNS-Methyltransferasehemmer. Es wird in die DNS inkorporiert und bindet die Methyltransferase kovalent. Da es in wässriger Lösung sehr instabil ist, wurde es in DMSO (1 mM) gelöst und in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M zu den Zellen gegeben. 24 Stunden vor der Behandlung wurden die Zellen ausgesät und anschließend für 4 Tage mit dem Reagenz inkubiert, wobei das Medium täglich abgesaugt und durch frisches Medium mit neu verdünntem 5-Aza-2'-Deoxycytidin ersetzt wurde. Als Negativkontrolle wurden Zellen parallel mit DMSO-haltigem Medium (1 mM) inkubiert. Nach 4 Tagen Behandlung konnte aus den Zellen je nach Fragestellung RNS oder DNS isoliert werden, oder die Zellen wurden einem MTT-Test zugeführt.

### 3.2.20 Microarray-Analyse mit DMH (Differential Methylation Hybridisation)-Chips

Die Differential Methylation Hybridisation ist eine Microarray-Methode zur Erkennung von Differenzen im DNS-Methylierungsmuster unterschiedlicher Proben.

Zur Generierung einer entsprechenden Sequenzbibliothek wurde menschliche DNS mit MseI verdaut. Das Enzym hat die Erkennungssequenz TTAA, welche selten in CpG-Inseln vorkommt, so dass diese in der Regel intakt bleiben, während die DNS generell in 200 - 2000 bp lange Fragmente zerlegt wird. Diese Fragmente der Bibliothek, die unter anderem CpGs aus Promotorregionen und ersten Exonen enthalten, wurden auf Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme BstUI und HpaII (s.u.) selektiert, *in vitro* methyliert und über eine Säule mit dem Enzym MeCP2 angereichert. Diese methylierten Sequenzen der Bibliothek wurden mit Hilfe der PCR unter Verwendung von Plasmid Primern amplifiziert und auf UltraGAPS Microarrays (Corning, Acton, MA) fixiert. Die Aufbereitung der DNS-Proben erfolgte nach dem Schema in Abbildung 5:



Modifiziert nach T. Huang et al., J Nutr., 2002

**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung für die genomweite Analyse des DNS-Methylierungsmusters mittels DMH. Die gefüllten Kreise stellen methylierte CpGs dar, ungefüllte markieren unmethylierte CpGs.**

Die Proben-DNS wurde ebenfalls zunächst mit MseI verdaut. Dazu wurden 2 µg DNS, jeweils 7,5 µl MseI, 10xBSA und 10xNEB Puffer 2 zu insgesamt 75 µl mit Wasser gemischt und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor der Verdau mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt wurde. Der Überhang der DNS-Fragmente wurde mit einem Adaptermix aus H-12 und H-24 Oligonukleotiden (vgl. 3.1.3) ligiert. Je 3,5 µl Oligonukleotid (100 µM) wurden dafür gemischt und im Wasserbad von 65°C auf 30°C in etwa 90 Minuten bei RT abkühlen gelassen und dann in ca. 30 Minuten bei 4°C auf 20°C gebracht. Für die Adapterligation wurden 7 µl der Mischung mit 13,5 µl Proben-DNS, 2 µl T4-Ligase und 2,5 µl T4-Puffer für 16 Stunden bei 14°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte erneut mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit. Die Kontrolle des MseI-Verdau und der Adapterligation erfolgte

durch eine PCR mit H24 Primern und anschließender gelelektrophoretischer Überprüfung. Dazu wurden 1 µl Probe, 0,4 µl dNTPs (2 mM), 2 µl 10xPuffer, 0,5 µl H24 Primer, 0,8 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µl Taq Polymerase (Invitrogen) und 15,1 µl Wasser für 5 Minuten auf 72°C, 1 Minute auf 97°C und 3 Minuten auf 72°C erhitzt. Nach 25 Zyklen wurde für 10 Minuten auf 72°C erwärmt. Die mit Adaptern versehenen, CpG-reichen DNS-Fragmente wurden dann mit den zwei methylierungsspezifischen Enzymen BstUI (Erkennungssequenz s. 3.2.18) und HpaII (Erkennungssequenz CCGG) verdaut. Hierbei bleiben methylierte Sequenzen intakt, unmethylierte werden verdaut. Es wurden 16 µl DNS mit 2 µl BstUI und 10xNEB Puffer 2 gemischt und für 16 Stunden bei 60°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte wie oben beschrieben. Für den folgenden HpaII-Verdau wurden 16 µl Probe mit 2 µl Enzym und 2 µl 10xNEB Puffer 1 gemischt und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Aufreinigung erfolgte die PCR-Amplifikation der verdauten Fragmente, wobei nur methylierte, intakte Sequenzen beide Adapter trugen und vervielfältigt werden konnten. Es wurden 15 µl Probe, 6 µl dNTPs (2 mM), 30 µl 10xPuffer, 7,5 µl H24 Primer, 12 µl MgCl<sub>2</sub>, 3 µl Taq Polymerase und 226,5 µl Wasser gemischt und 20 Zyklen der Reaktion wie oben beschriebenen durchgeführt. Nach einer Qualitätskontrolle auf einem 2%igen Agarosegel wurden die amplifizierten, methylierten DNS-Fragmente mit einem Cy3- (Wildtyp) oder Cy5-Farbstoff (DNS aus resistenten Zellen) grün, bzw. rot markiert. Durch die Zugabe von 10 µg Cot-1 DNS wurde hochrepetitive DNS, die durch ein starkes Fluoreszenzsignal die digitale Bildauswertung beeinflussen würde, abgesättigt.

Die DMH-Chips wurden unter Verwendung des Universal Microarray Validation Kits (Fa. Corning) prehybridisiert und gewaschen. Die Cy3 und Cy5 markierte Probe wurden gemischt und in insgesamt 50 µl Universal-Hybridisierungs-Lösung 5 Minuten auf 95°C gebracht und abkühlen gelassen, bevor sie auf den Chip kohybridisiert wurden. Sie wurden für 16 Stunden im Hybridisierungssofen bei 42°C inkubiert, dann wurde der Chip gewaschen und gescannt. Die Auswertung erfolgte mit der GenePix Pro 5.0 Bildanalyse Software. Die Menge des gebundenen Probenmaterials korrelierte dabei mit dem gescannten Fluoreszenzsignal. Es wurde für die einzelnen DNS-Fragmente das Verhältnis zwischen der Signalstärke aus den sensitiven Zellen zu dem aus den resistenten Zellen berechnet. Als hypermethyliert galten Sequenzen, bei denen das Verhältnis der Signalstärke Cy5/Cy3 größer als oder gleich 1,5 war, als hypomethyliert galten Sequenzen mit einem Quotienten aus Cy5/Cy3 von 0,5 oder kleiner. Sequenzen,

die in beiden Sublinien gleich methyliert waren, wiesen einen Quotienten von 1 auf. Die Normalisierung der Chipdaten erfolgte mit Housekeeping-Genen, die generell ein gleiches Methylierungsmuster aufweisen und vergleichbar stark exprimiert werden, indem ihnen der Quotient 1 zugeteilt wurde und die anderen Signalstärken hiermit abgeglichen wurden.

### **3.2.21 RNS-Interferenz**

Das als RNS-Interferenz bezeichnete Verfahren beruht auf der Destabilisierung der mRNA durch doppelsträngige, sequenzhomologe RNS. Dies kann durch die nachfolgend erklärten zwei verschiedenen Methoden erreicht werden: siRNS (kurze Interferenz-RNS)- oder shRNS (kurze Haarnadel RNS)-Transfektion.

#### **siRNS-Transfektion**

Die ZFP37-Expression wurde in LAN1 Zellen durch Transfektion mit siRNS transient unter Verwendung des HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) herunterreguliert, um mögliche Auswirkungen der verminderten Expression auf die Resistenzentwicklung zu testen.

Das lyophilisierte sense und antisense Oligonukleotid mit der Sequenz r(GGG UUG UUA UAU AUG UAA A)dTdT, bzw. r(UUU ACA UAU AUA ACA ACC C)dTdT wurde von der Firma Qiagen synthetisiert. Es wurde in 500 µl siRNS-Suspensionspuffer von Qiagen zu einer Konzentration von 10 pmol/µl unter sterilen Arbeitsbedingungen gelöst. Um möglicherweise im Lyophilisat vorhandene Aggregate aufzulösen, wurde die gelöste DNS für eine Minute auf 90°C erwärmt und anschließend 60 Minuten bei 37°C inkubiert. 2 µl siRNS (20 pmol) wurden als Dreifachansatz in je einem Well einer 96-Well Zellkulturplatte vorgelegt. Zu der siRNS wurden 1 µl HiPerFect Transfektionsreagenz und 24 µl serumfreies Medium pipettiert. Als Negativkontrolle wurde Transfektionsreagenz ohne siRNS verwendet. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich Transfektionskomplexe bilden konnten. Anschließend wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in 180 µl serumfreiem Medium hinzugefügt und für 24 Stunden bei 37°C transfiziert. Zur visuellen Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen parallel mit 20 pmol Alexafluor markierter siRNS transfiziert und unter

dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das Protokoll wurde so optimiert, dass das Verhältnis von aufgenommener zu freier siRNS möglichst groß wurde.

Zur Auswertung der siRNS-Transfektion wurde nach 24 oder 48 Stunden die RNS aus den Zellen isoliert, in cDNS umgeschrieben (s. 3.2.6) und die ZFP37-Expression mittels PCR im Vergleich zu untransfizierten Zellen bestimmt.

### shRNS-Transfektion

LAN1 Wildtypzellen wurden stabil mit ZFP37-shRNS und pBD631 als Vektor transfiziert. Zunächst wurde der Vektor in *E. coli* DH5α Zellen amplifiziert (vgl. 3.2.22). 10 µg Plasmid wurden mit den Enzymen BglII und HindIII der Firma New England Biolabs linearisiert. Für den BglII-Verdau wurde die entsprechende Menge Plasmid mit 1 µl Enzym (10.000 U/ml) und 10 µl 10xNEB3 Puffer versetzt und auf 100 µl mit Wasser aufgefüllt. Nachdem für 3 Stunden bei 37°C inkubiert wurde, wurde der Ansatz nach Zugabe von 70 µl Isopropanol und 1 µl Glycogen gefällt, gewaschen und das linearisierte Plasmid in Wasser resuspendiert. Die Linearisierung wurde auf einem 0,8%igen Agarosegel überprüft. Für den nun folgenden HindIII-Verdau wurden 1 U Enzym, 10 µl 10xNEB2 Puffer und Wasser auf 100 µl zugegeben und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor das Enzym bei 65°C für 5 Minuten inaktiviert wurde. Die einzubringende shRNS war so konstruiert, dass sie komplementär zu den durch den Verdau mit BglII und HindIII entstandenen Überhängen war:

```
5' GATCCC  AAG GGT TGT TAT ATA TGT AAA  TTCAAGAGA  TTT ACA TAT ATA ACA ACC CTT  TTTTTTGGAAA -3'
          3' GG   TTC CCA ACA ATA TAT ACA TTT  AAGTTCTCT  AAA TGT ATA TAT TGT TGG GAA  AAAAAACCTTTTCGA -5'
```

(Target Sequence)

(Loop)

Der doppelt geschnittene Vektor wurde durch Gelextraktion aus einem 0,7%igen Agarose-Gel aufgereinigt. Als Kontrolle wurde auf dem Agarose-Gel ungeschnittenes Plasmid aufgetragen. Die Gelextraktion erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Die Linearisierung des Vektors wurde mit Hilfe eines 0,7 %igen Agarose-Gels überprüft. Die shRNS-Sequenz zum ZFP37-Gen wurde unter Verwendung der „siSearch“-Datenbank [sisearch.sbc.su.se, (Chalk, Wahlestedt et al. 2004)] konstruiert. Eine 9 bp-lange Schleifensequenz sowie der 5'- bzw. 3'-Überhang

komplementär zur BglII- und HindIII-Schnittstelle wurden entsprechend der Beschreibung der Originalarbeit angefügt (Biard, Despras et al. 2005).

Die shRNS-Oligonukleotide wurden auf eine Konzentration von 3 µg/µl mit Wasser verdünnt. Jeweils 1 µl der sense und antisense Sequenz wurden gemischt und mit 48 µl Puffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) versetzt. Im Thermocycler wurden die Oligonukleotide unter folgenden Bedingungen denaturiert und hybridisiert: Erwärmung auf 95°C, 90°C, 85°C, 80°C, 75°C und 70°C für jeweils 5 Minuten, 37°C für 30 Minuten, Abkühlen auf 4°C.

Für die Ligation mit dem Vektor wurden 4 µl Oligonukleotide mit 2 µl geschnittenem pBD631-Vektor, je 1 µl T4-Ligase und T4-Ligase Puffer und 2 µl Wasser gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Zur Aufreinigung des Vektors aus dem Ligationsansatz wurde dieser mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt, mit 1 µl Glykogen und 350 µl Ethanol versetzt und nach 3 Stunden Inkubation bei 4°C für 30 Minuten mit maximaler Geschwindigkeit bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Vektorpellet getrocknet und in 10 µl Wasser gelöst. Zur Vervielfältigung dieses Vektors wurden *E. coli* TOP10 (Fa. Invitrogen) mit den gesamten 10 µl Vektorlösung transformiert und über Nacht auf LB-Platten unter Ampicillinselektion vermehrt (3.2.22).

Die Vektor-DNS wurde mit dem E.Z.N.A. Plasmid Purification Kit der Firma Peqlab isoliert und Plasmide, die noch mit HindIII, aber nicht mehr mit BglII verdaubar waren (s. Vektorkarte Anhang 1, Seite 111), wurden sequenziert (Primersequenz pBD631 s. 3.1.3).

Mit dem so produzierten pBD631-shZFP37 Vektor wurden LAN1 Wildtypzellen transfiziert. Als Negativkontrolle wurde der pBD631-Leervektor verwendet. Hierzu wurden 200.000 Zellen pro Well in einer 12-Wellplatte über Nacht in 1 ml RPMI-Medium ohne Serum und Antibiotikum inkubiert, bevor das Medium durch 1 ml Opti-MEM® I Medium ohne Serum oder Antibiotikum ersetzt wurde. 4 µl Lipofectamine™ 2000 (Fa. Invitrogen) wurden in 100 µl Opti-MEM® I Medium ohne Serum verdünnt und 5 Minuten bei RT inkubiert. 1,6 µg pBD631-shZFP37 Vektor oder Leervektor wurden ebenfalls mit 100 µl Opti-MEM® I Medium gemischt und zu dem verdünnten Lipofectamine gegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei RT wurden 200 µl dieses Mixes zu den Zellen pipettiert, vorsichtig durch Schwenken der Platte gemischt und die Zellen über Nacht bei 37°C transfiziert.

Zur Generierung stabil transfizierter Zelllinien aus Einzelklonen wurden die Zellen in einem „limited dilution assay“ so verdünnt und ausgesät, dass sich 2 oder 4 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte befanden. Die Zellen wurden für 24 Stunden in 100 µl RPMI Medium mit Serum und Antibiotikum inkubiert und dann in Selektionsmedium mit Hygromycin überführt, so dass sich nur die mit shRNS- oder Leervektor transfizierten Zellen vermehren konnten. Dann wurden die Kolonien aus Einzelklonen separiert und kultiviert.

### **3.2.22 Transformation von *E. coli***

1 µl des verdünnten Vektors wurde 30 Minuten auf Eis in Gegenwart der *E. coli* DH5α oder TOP10 Bakterienzellen inkubiert. Nachdem sie für 45 Sekunden auf 42°C erwärmt wurden, wurden die Bakterien 2 Minuten auf Eis gestellt und in 250 µl SOC Medium bei 37°C inkubiert. Dann wurden sie auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Zur Isolierung der Plasmid-DNS wurde eine der gebildeten Bakterienkolonien gepickt und über Nacht in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin vermehrt. Unter Verwendung des Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen wurde der vervielfältigte Vektor aus der Bakterienkultur extrahiert.

### **3.2.23 Durchflußzytometer-Analyse**

Mit dieser Analysenmethode wurde die Expression des Oberflächenmarkers MDR1 bestimmt, der an der Resistenzentwicklung gegen bestimmte Zytostatika wie Etoposid und Doxorubicin beteiligt ist. Es wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen verschiedener Sublinien mit dem Coulter Counter abgezählt und in 200 µl PBS Puffer auf Eis suspendiert. Sie wurden für 15 Minuten nach Zugabe von 10 µl Primär-Antikörper oder PBS als Negativkontrolle bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen viermal mit kaltem PBS bei 4°C gewaschen. Nach Zugabe von 10 µl FITC-markiertem Zweitantikörper wurden sie für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nachdem die Zellen erneut viermal mit PBS gewaschen wurden, wurden sie in 1 ml PBS suspendiert. Um tote oder sterbende Zellen von der späteren Auswertung auszuschließen, wurden diese mit Propidiumiodid angefärbt, indem den Proben 10 µl Propidiumiodidlösung (1 mg/ml, vgl. 3.1.7) zugemischt wurde. Durch Messung der von den Zellen emittierten Fluoreszenz wurde die Anzahl der vitalen, MDR1-exprimierenden Zellen bestimmt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Expo32 (Fa. Beckman Coulter).



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Zelllinienmodelle

#### 4.1.1 Bestimmung der IC<sub>50</sub> für resistente und sensitive Zellen

Die IC<sub>50</sub>-Dosen für Doxorubicin, Cisplatin und Etoposid sowie der jeweilige Resistenzgrad der LAN1 und Kelly Zellen wurde mit Hilfe des MTT- und SRB-Tests bestimmt (s. 3.2.2). Um zu überprüfen, ob beide Methoden das gleiche Ergebnis liefern, wurden exemplarisch die IC<sub>50</sub>-Dosen und Resistenzfaktoren (RF) mit Hilfe des SRB- und MTT-Tests in LAN1 Zellen bestimmt und verglichen. Die IC<sub>50</sub>-Dosen sowie die RF, die für die resistenten Sublinien im Vergleich zu den sensitiven Wildtypzellen berechnet wurden, sind für LAN1 Zellen in Tabelle 3, Seite 57 dargestellt. Die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen der Zytostatika, die unter Verwendung des MTT-Tests bestimmt wurden, waren tendenziell höher als die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen, die im SRB-Test ermittelt wurden. Zwischen beiden Analysemethoden betrug die Abweichung der Resistenzfaktoren gegen das jeweilige Zytostatikum 1,6%, so dass die Ergebnisse der beiden Methoden miteinander vergleichbar sind.

**Tabelle 3: IC<sub>50</sub>-Dosen in LAN1 Zellen in µg/ml Medium für Doxorubicin, Etoposid und Cisplatin sowie Resistenzfaktoren (RF) für die resistenten Sublinien (n.b. = nicht bestimmt, WT = Wildtypzellen, Doxo<sup>R</sup> = Doxorubicin-, CP<sup>R</sup> = Cisplatin-, Etop<sup>R</sup> = Etoposid-resistente Zellen).**

<b>Zytostatikum</b>	<b>Doxorubicin</b>		<b>Etoposid</b>		<b>Cisplatin</b>	
	<b>WT</b>	<b>Doxo<sup>R</sup></b>	<b>WT</b>	<b>Etop<sup>R</sup></b>	<b>WT</b>	<b>CP<sup>R</sup></b>
IC <sub>50</sub> laut SRB [µg/ml]	0,05	1,5	0,57	2,7	0,63	2,4
IC <sub>50</sub> laut MTT [µg/ml]	0,07	2,18	0,63	3	n.b.	n.b.
RF laut SRB		30		5		4
RF laut MTT		31		5		n.b.

Für die Kelly Sublinien sind die Konzentrationen der Zytostatika, bei der die IC<sub>50</sub> erreicht wurde und die entsprechenden Resistenzfaktoren in Tabelle 4, Seite 58 dargestellt:

**Tabelle 4: IC<sub>50</sub>-Dosen der Zytostatika für die sensitiven Wildtypzellen (WT) und Doxorubicin (Doxo<sup>R</sup>)-, Cisplatin (CP<sup>R</sup>)-, bzw. Etoposid (Etop<sup>R</sup>)-resistenten Kelly Zellen mit dem jeweils dazugehörigen Resistenzfaktor (RF).**

Sublinie	Doxorubicin [µg/ml]	Cisplatin [µg/ml]	Etoposid [µg/ml]	RF
WT	0,034	0,3	0,25	
Doxo <sup>R</sup>	0,68			20
CP <sup>R</sup>		1		3
Etop <sup>R</sup>			1	4

#### 4.1.2 Analyse von Kreuzresistenzen

Zur Überprüfung, ob zwischen den Doxorubicin-, Etoposid- oder Cisplatin-resistenten Zellen eine Kreuzresistenz bestand, wurden die resistenten Zellen mit steigenden Dosen der jeweils anderen Zytostatika inkubiert. Die IC<sub>50</sub> wurde mit Hilfe des SRB-Assays bestimmt. Zur Berechnung des RF wurden parallel LAN1 Wildtypzellen inkubiert und ihre IC<sub>50</sub> bestimmt.

Die Analyse ergab, dass eine Kreuzresistenz zwischen Doxorubicin- und Etoposid-resistenten Zellen bestand. Die Doxorubicin-resistenten Zellen waren 30fach resistenter gegenüber Etoposid im Vergleich zum Wildtyp, die Etoposid-resistenten Zellen 5fach gegen Doxorubicin (vgl. Tabelle 5, Seite 58). Die Cisplatin-resistenten Zellen zeigten mit einem RF von 1,7 gegen Doxorubicin, bzw. 2,1 gegen Etoposid keine oder nur eine leichte Kreuzresistenz gegen diese Arzneistoffe. Vice versa waren die Doxorubicin- oder Etoposid-resistenten Zellen nicht resistent gegen Cisplatin.

**Tabelle 5: Resistenzfaktoren (RF) bestimmt durch SRB-Analyse zur Ermittlung von Kreuzresistenzen in LAN1 (WT = Wildtypzellen, Doxo<sup>R</sup> = Doxorubicin-, CP<sup>R</sup> = Cisplatin-, Etop<sup>R</sup> = Etoposid-resistente Zellen).**

Zytostatikum	Sublinie	IC <sub>50</sub> [µg/ml]	RF
Doxorubicin	WT	0,055	
	CP <sup>R</sup>	0,045	0,8
	WT	0,044	
	Etop <sup>R</sup>	1,3	30
Etoposid	WT	0,43	

	CP <sup>R</sup>	0,51	1,2
	WT	0,44	
	Doxo <sup>R</sup>	2,2	5,0
Cisplatin	WT	0,71	
	Doxo <sup>R</sup>	1,18	1,7
	WT	0,6	
	Etop <sup>R</sup>	1,3	2,1

## 4.2 Vergleich des DNS-Methylierungsmusters in resistenten versus sensitiven Zellen mittels DMH-Analyse

In einer genomweiten Analyse wurde mit Hilfe der Differential Methylation Hybridisation (vgl. 3.2.20) untersucht, ob sich das DNS-Methylierungsmuster der Doxorubicin-, Etoposid- oder Cisplatin-resistenten NB Zelllinien von dem der chemotherapie-sensitiven Zellen unterscheidet. In Tabelle 6, Seite 59 ff sind die Daten von DNS-Abschnitten aufgeführt, die in mindestens zwei resistenten Sublinien abweichend methyliert vorliegen sollten, um sublinienspezifische Methylierungsaberrationen auszuschließen. War das Verhältnis der Signalstärke aus resistenten zu sensitiven Zellen für das jeweilige hybridisierte DNS-Fragment kleiner oder gleich 0,5 war die Sequenz hypomethyliert (grün hinterlegt), ab 1,5 war sie hypermethyliert (rot hinterlegt). Die Gesamtübersicht der differentiell methylierten Gene in Cisplatin-, Etoposid- oder Doxorubicin-resistenten Zellen ist im Anhang 2 Seite 112 ff dargestellt. Insgesamt waren 45% der detektierten hyper- oder hypomethylierten Sequenzen Bestandteil repetitiver, bzw. nicht-codierender Elemente.

**Tabelle 6: Abweichend methylierte Gene, die in mindestens zwei der Cisplatin-, Etoposid- oder Doxorubicin-resistenten LAN1 Zellen im Vergleich zu sensitiven Zellen detektiert wurden. Angegeben ist das Verhältnis der Signalstärke der resistenten versus sensitiven Zellen: > 1,5 = Hypermethylierung in resistenten Zellen (rot markiert), < 0,5 = Hypomethylierung (grün) (Rep/Mito = repetitive/mitochondriale Sequenz, die Genbezeichnungen beruhen auf den Annotationen in GenBank® [[www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)])**

Chip-ID	CP <sup>R</sup>	Etop <sup>R</sup>	Doxo <sup>R</sup>	Gen	Lokus	Beschreibung
A20:2	0.336	0.156	0.494		4p11	
B12:13	0.386	0.417	0.428		7q11.21	no gene
B16:17	0.391	0.477	0.374	Rep/Mito		

B2:4	0.369	0.422	<no data>		5q33.2	
B7:14	0.324	0.248	<no data>		10q11.1	no gene
C18:7	0.352	0.352	<no data>	AK002179	1p22.3	Hypothetical protein FLJ11317.
C24:12	0.432	0.246	<no data>	Rep/Mito		
C24:9	0.392	0.181	0.481	Rep/Mito		
C9:13	0.363	0.213	0.399		16q11.2	no gene
C9:17	0.456	0.210	<no data>			Chromosome 5 clone
D14:19	0.443	0.479	<no data>	Rep/Mito		
D2:15	0.346	0.325	<no data>		Xq21.33	
D20:20	0.527	1.718	1.925	<b>ZFP37</b>	9q32	Zinc finger protein 37 homolog (Zfp-37).
D5:9	0.268	0.466	<no data>	SF3B3	16q22.1	SF3B3 protein.
E19:19	0.454	0.236	0.488			unspezifisch
E21:13	0.393	0.351	0.441		19q12	no gene
F19:17	0.487	0.161	0.446	Rep/Mito		
F3:8	0.392	<no data>	1.903	<b>ZFP37</b>	9q32	Zinc finger protein 37 homolog (Zfp-37).
F6:20	0.460	1.710	1.726	<b>ZFP37</b>	9q32	Zinc finger protein 37 homolog (Zfp-37).
G10:20	0.353	0.455	<no data>	BX647589	2q37.2	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp313I1130 (from clone DKFZp313I1130), Promotorregion
G13:6	0.388	0.164	<no data>		10q11.1	
G14:1	0.305	0.152	0.512	KIAA1287	17q23.2	Hypothetical protein KIAA1287 (Fragment)
G18:7	0.327	0.354	<no data>	HSF2	6q22.31	heat shock transcription factor 2
G23:13	0.365	0.211	<no data>		16q11.2	no gene
G23:6	0.325	0.293	0.439		19q12	
G24:18	0.425	0.320	<no data>	Rep/Mito		
H18:14	0.296	0.136	<no data>			CpG island
H19:7	0.266	<no data>	1.540	<b>ZFP37</b>	9q32	Zinc finger protein 37 homolog (Zfp-37).
H3:13	0.341	0.217	<no data>		19q12	no gene
H5:19	0.363	0.427	<no data>	chr10_426.1	10q11.21	
I12:12	0.409	0.330	<no data>	TRIB2	2p24.3	GS3955 (Tribbles homolog 2) (TRB2 protein).
I14:18	0.405	0.236	0.486	Rep/Mito		
I16:19	0.412	<no data>	0.446	NT_011669.s	Xq11.2	
J17:20	0.389	0.472	0.469	Rep/Mito		
K11:10	0.390	0.449	<no data>	ELSPBP1	19q13.32	Seminal plasma protein-like protein.
K2:20	0.497	0.199	<no data>			unspezifisch
K20:17	0.385	0.459	<no data>		Xp21.3	no gene
L13:15	0.234	0.166	<no data>			alpha satellite DNA, D8Z2 gene (7e-42)
L17:7	0.334	0.414	<no data>			Chr. 14 DNA
L18:8	0.273	<no data>	2.307	BX641014	9p11.2	Human mRNA from Genbank
L21:20	0.403	0.182	0.485			Cloning vector, mRNA from HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma
L22:5	0.329	0.396	<no data>	NT_022517.378	3p24.3	
L5:16	0.327	0.206	<no data>	Rep/Mito		
M10:13	0.325	0.410	0.435	<b>PGAP1</b>	2q33.1	GPI deacylase
M19:13	0.387	0.379	<no data>		16q11.2	unspezifisch
N1:5	0.394	0.077	<no data>		4p11	
N17:16	0.408	0.268	0.534	LHX4	1q25.2	LIM homeobox 4
N2:16	0.340	0.235	<no data>		18q11.1	hinter ROCK1
N2:20	0.405	0.347	0.471	Rep/Mito		
N21:16	0.412	0.187	0.456			unspezifisch
N6:16	0.427	0.309	0.504	unspezifisch	10q11.21	HERV-K LTR element

N8:16	0.492	0.227	<no data>		4	
O11:11	0.396	0.224	0.394		4	
O12:15	0.408	<no data>	1.745	NT_033172.1	6p11.2	
O22:18	0.488	0.278	<no data>		16q11.2	no gene
O24:13	0.473	0.135	<no data>	Rep/Mito		
O3:12	0.389	0.388	<no data>	SERPING1	11q12.1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1
O3:14	0.340	0.213	<no data>			no matches found
O3:9	0.374	0.162	<no data>	Rep/Mito		
O5:5	0.265	0.456	<no data>		20	
O6:2	0.343	0.358	<no data>		unspezifisch	
O8:6	0.357	0.147	<no data>			unspezifisch
P13:11	0.431	0.103	0.513	CpG	1q23.3	CpG29
P17:16	0.379	0.455	<no data>	NT_007592.446	6p22.1	
P19:18	0.355	0.450	<no data>	NT_037852.2	15q11.2	
P2:14	0.323	0.119	<no data>			CpG island
P8:16	0.328	0.223	0.457	unspezifisch	7q11.21	
P9:17	0.374	0.269	0.344	Rep/Mito		

In den resistenten LAN1 Zellen zeigten nur die folgenden zwei Gene in allen resistenten LAN1 Sublinien eine DNS-Hypermethylierung oder Hypomethylierung im Vergleich zum Wildtyp: ZFP37 und PGAP1 (in Tabelle 6, Seite 61 ff gelb hinterlegt). Das Gen PGAP1 (Post-GPI Attachment to Proteins 1) war in allen untersuchten resistenten LAN1 Sublinien hypomethyliert. Es kodiert für eine Inositoldeacylase, die die Inositol Deacylierung von Glycosylphosphatidylinositol (GPI) im endoplasmatischen Retikulum (ER) katalysiert (Tanaka, Maeda et al. 2004). Diese Deacylierung ist für den Transport von GPI-assoziierten Proteinen vom ER zum Golgi Apparat von Bedeutung. Um auszuschließen, dass es sich bei der Hypomethylierung von PGAP1 in resistenten LAN1 Zellen um ein zelllinienspezifisches Phänomen handelte, wurde eine weitere DMH-Analyse mit resistenten versus sensitiven Kelly Zellen durchgeführt. Diese zeigte keine abweichende Methylierung des PGAP1-Gens in resistenten Kelly Zellen. Daher wurde die Analyse dieses Gens nicht weiter vertieft.

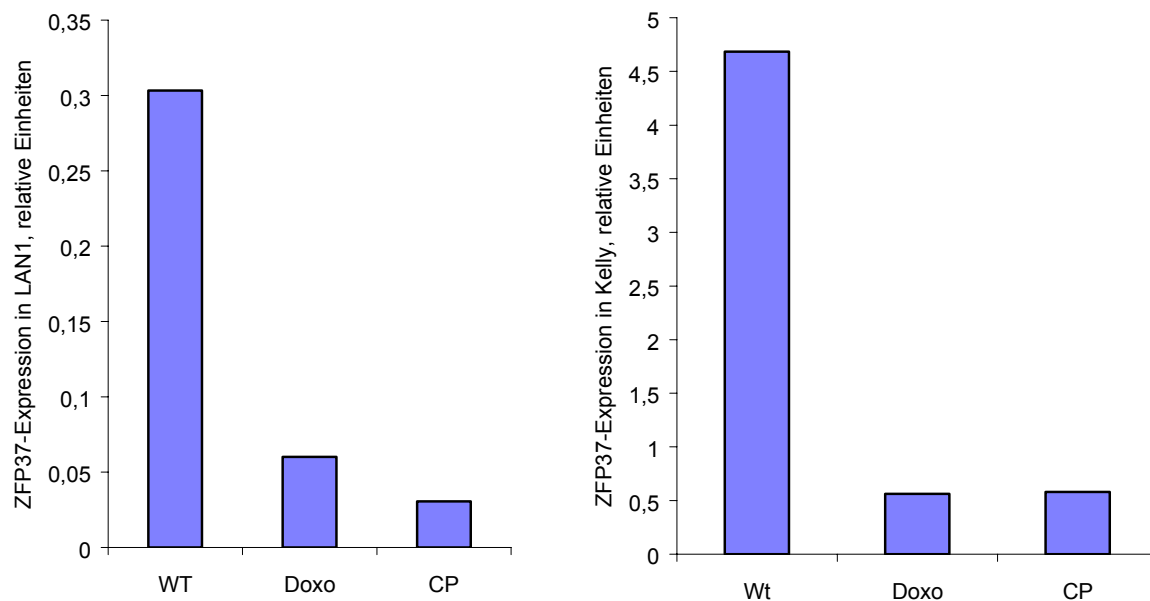
Bei dem Zinkfingerprotein ZFP37 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, vermutlich um einen transkriptionellen Repressor (Payen, Verkerk et al. 1998). Das Gen war in Doxorubicin- und Etoposid-resistenten LAN1 Zellen hypermethyliert, in Cisplatin-resistenten LAN1 Zellen dagegen hypomethyliert. In den Cisplatin-resistenten Kelly Zellen zeigte ZFP37 in der DMH-Analyse ebenfalls eine Hypermethylierung, in Doxorubicin- und Etoposid-resistenten Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede in der DNS-Methylierung. (Paz, Wei et al. 2003) zeigten, dass ZFP37 in kolorektalen

primären Karzinomen und Zelllinien hypermethyliert war, während es in gesundem Kolongewebe unmethyliert vorlag. Da das Gen in beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten NB Zelllinien ein abweichendes Methylierungsmuster in den resistenten versus sensiblen Zellen aufwies und seine aberrante Methylierung bereits mit einer Tumorerkrankung assoziiert war, wurde seine epigenetische Regulation in resistenten NB Zellen, sowie seine Funktionen und mögliche Beteiligung an einer Resistenzentwicklung in dieser Arbeit näher untersucht.

### **4.3 Untersuchungen zur Expression und epigenetischen Regulation der Kandidatengene**

#### **4.3.1 Vergleich der ZFP37-Genexpression in resistenten versus sensiblen Neuroblastomzellen im präklinischen Modell**

Die Expression von ZFP37 in chemotherapieresistenten Zellen wurde durch semiquantitative PCR mit der Expression in therapiesensiblen Wildtypzellen verglichen. Als Modell für resistente Tumoren wurden die gegen Doxorubicin oder Cisplatin resistent gezüchteten LAN1 und Kelly Zellen verwendet (vgl. 4.1). Die ZFP37-Expression wurde gegen die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH normalisiert. Die Expression in Doxo<sup>R</sup> oder CP<sup>R</sup> LAN1 Zellen war etwa 6fach niedriger als in LAN1 Wildtypzellen. In Kelly Zellen war die ZFP37-Expression in den gegen Doxorubicin oder Cisplatin resistenten Zellen etwa 9fach erniedrigt im Vergleich zum Wildtyp (s. Abbildung 6).



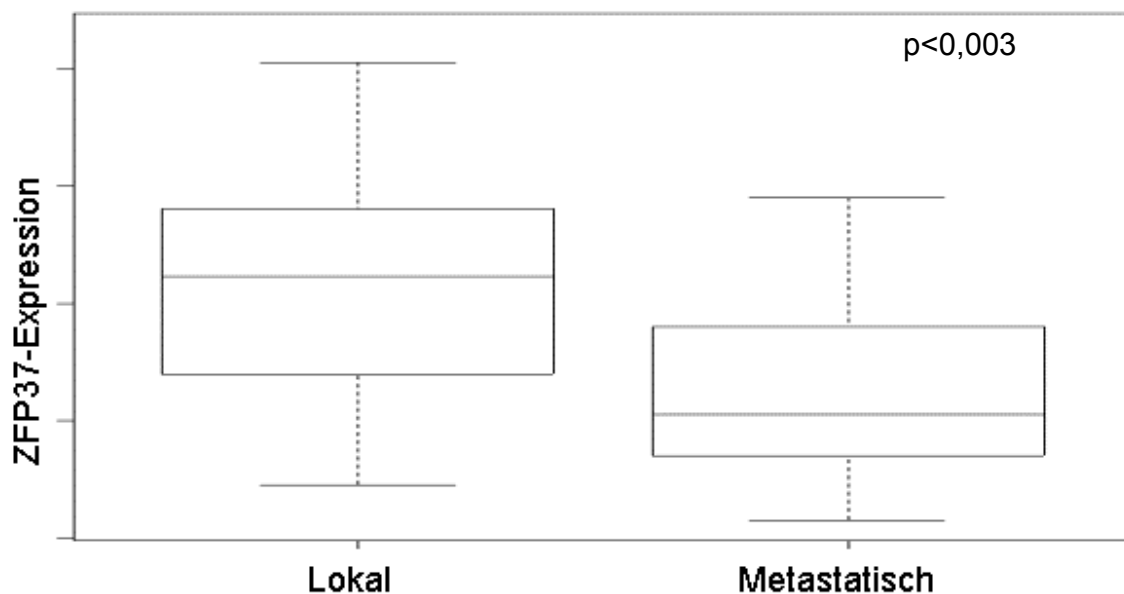
**Abbildung 6:** Die densitometrische Auswertung der semiquantitativen PCR (mit GAPDH als internem Standard) zeigte, dass die ZFP37-Expression sowohl in LAN1 Zellen als auch in Kelly Zellen, die resistent sind gegen die Behandlung mit Doxorubicin oder Cisplatin, 6fach, bzw. 9fach verringert war im Vergleich zum Wildtyp (WT = Wildtyp, Doxo = gegen Doxorubicin-resistente Zellen, CP = gegen Cisplatin resistente Zellen).

Das Ergebnis dieser Expressionsanalyse korrelierte mit der transkriptionellen Repression von ZFP37 in den resistenten Sublinien im Vergleich zu den chemotherapiesensiblen Elternzellen, die in der DMH-Analyse festgestellt wurde.

#### 4.3.2 Analyse der ZFP37- und IGSF4-Expression in primären Neuroblastomen

Um zu untersuchen, ob die differentielle Regulation von ZFP37 im Zellkulturmodell auch auf Primärtumoren übertragbar ist, wurde die ZFP37-Expression in Tumorproben von 68 Patienten bestimmt. Davon stammten 20 Proben aus Patienten mit Stadium 1 Neuroblastomen, 16 aus Stadium 2, 7 aus Stadium 3, 15 aus Stadium 4 und 10 aus Stadium 4s. Diese Kohorte war in einer früheren Arbeit zur Risikovorhersage beim Neuroblastom erfolgreich eingesetzt worden (Schramm, Schulte et al. 2005). Der Expressionsgrad wurde in den einzelnen Tumoren mittels semiquantitativer Real-Time PCR bestimmt und mit dem Tumorstadium verglichen. Mit Hilfe des exakten Fisher-Tests wurde die Korrelation zwischen der ZFP37-Expression und dem Stadium

analysiert. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als signifikant gewertet. Die Box-Plot-Darstellung zeigt den signifikanten Unterschied der ZFP37-Expression in lokalen Tumoren aus Stadium 1 und 2 versus Expression in metastasierten Tumoren aus höheren Stadien mit schlechter Prognose (Abbildung 7) ( $p < 0,003$ ). In den Neuroblastomen höherer Stadien war die Expression von ZFP37 durchschnittlich um die Hälfte reduziert im Vergleich zu den lokalen Tumoren eines günstigeren Stadiums.



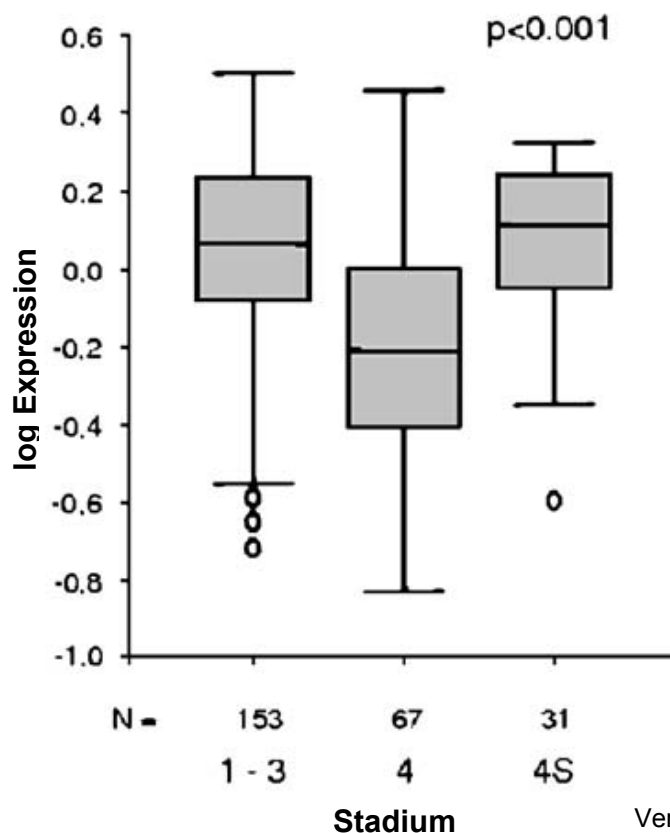
**Abbildung 7: Box-Plot-Darstellung der ZFP37-Expression in 68 primären Neuroblastomen aller Stadien. Die semiquantitative Real-Time PCR zeigte, dass die ZFP37-Expression in metastasierten Neuroblastomen mit schlechter Prognose signifikant vermindert war ( $p = 0,003$ ) im Vergleich zu lokalen Tumoren der Stadien 1 und 2.**

Zusätzlich zu ZFP37 wurde in dieser Arbeit mit IGSF4 ein weiteres interessantes Kandidatengen analysiert. Bei diesem Gen handelt es sich vermutlich um ein Tumorsuppressorgen, dessen verminderte Expression in Tumorerkrankungen mit einem fortgeschrittenen Stadium und schlechter Prognose einhergeht (Houshmandi, Surace et al. 2006). In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob eine verminderte IGSF4-Expression in primären Neuroblastomen mit fortgeschrittenem Tumorstadium epigenetisch durch Hypermethylierung der DNS reguliert ist.

Zur Analyse, ob eine verminderte IGSF4-Expression in Neuroblastomen mit einer ungünstigen Prognose korreliert, wurden Expressionsdaten einer publizierten



Microarraystudie (Oberthuer, Berthold et al. 2006) für IGSF4 reanalysiert (Nowacki, Skowron et al. 2008). Dazu wurden 251 Tumorproben (69 aus Stadium 1, 44 aus Stadium 2, 40 aus Stadium 3, 67 aus Stadium 4 und 31 aus Stadium 4S) untersucht. In den Stadien 1 - 3 und 4S war die IGSF4-Expression ähnlich. In Tumoren des Stadiums 4 dagegen war der Expressionsgrad signifikant niedriger ( $p < 0,001$ ) als in den Tumoren mit günstigerer Prognose (s. Abbildung 8).



Verändert nach Nowacki et al., 2008

**Abbildung 8:** Die IGSF4-Expression war in Neuroblastomen des Stadiums 4 signifikant vermindert im Vergleich zur Expression in Tumoren aus den Stadien 1 bis 3 oder 4s. Die Expression wurde mit Hilfe der Microarray-Analyse von 251 primären Neuroblastomen ermittelt.

#### 4.3.3 Untersuchungen zur epigenetischen Regulation von ZFP37 und IGSF4

Schon seit langem ist bekannt, dass die Methylierung der DNS in der Regel eine Reprimierung der Genexpression bewirkt (Nan, Cross et al. 1998); bestätigt wurde dies auch für ausgewählte Zielgene im Neuroblastom (Alaminos, Davalos et al. 2004; Hoebeeck, Michels et al. 2009). Im Folgenden wurde mit verschiedenen Methoden

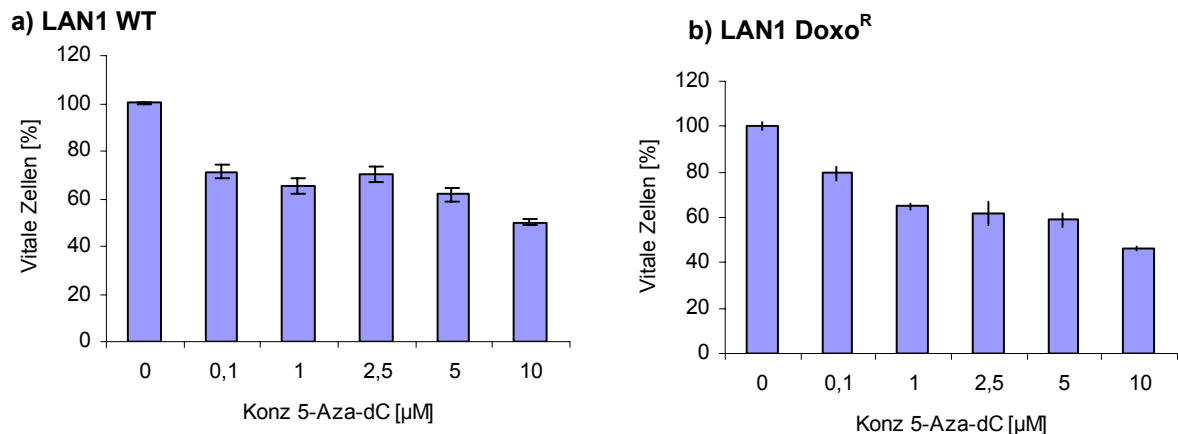
untersucht, ob die verminderte Expression von ZFP37 und IGSF4 auf einer DNS Hypermethylierung basiert.

#### **4.3.3.1 Analyse der ZFP37-Expression in Zelllinien nach DNS-Demethylierung**

Um zu analysieren, ob durch die Demethylierung der DNS die Expression des Kandidatengens -gemessen durch semiquantitative PCR- wiederhergestellt werden konnte, wurden Neuroblastomzellen *in vitro* mit dem Demethylierungsreagenz und Arzneimittel 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelt. Um Differenzen im DNS-Methylierungsmuster zwischen resistenten und sensitiven Zellen aufdecken zu können, wurden sie gleichermaßen behandelt, bevor eine Reexpression des Gens untersucht wurde. Da 5-Aza-dC auch eine zytotoxische Wirkung auf Neuroblastomzellen besitzt, wurde zunächst die optimale Dosis für die nicht-toxische Demethylierung bestimmt.

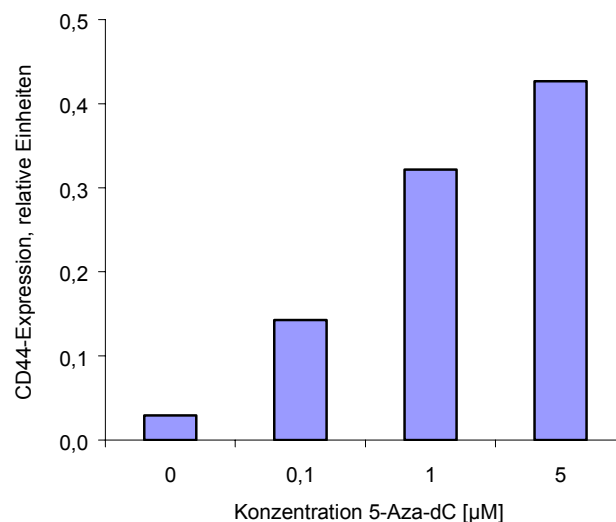
#### **Dosisfindung für die 5-Aza-dC-Behandlung von NB Zelllinien**

Die WT und resistenten Zellen wurden für 4 Tage mit unterschiedlichen Dosen 5-Aza-dC inkubiert (vgl. 3.2.19). Die MTT-Analyse zeigte, dass 5-Aza-dC zusätzlich zu seinem demethylierenden Effekt auf die Zellen zytotoxisch wirkte. Dabei wiesen bereits geringe Dosen 5-Aza-dC einen zytotoxischen Effekt auf. Die  $IC_{50}$  wurde jedoch erst bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M erreicht (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** MTT-Test mit (a) LAN1 WT und (b) LAN1 Doxo<sup>R</sup>-Zellen nach Inkubation für 4 Tage mit steigenden Dosen 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC): 5-Aza-dC wirkte auf den WT und die resistenten Zellen ähnlich zytotoxisch. Die Zellvitalität sank mit steigenden Dosen 5-Aza-dC.

Als Positivkontrolle zur Dosisfindungsanalyse für die demethylierende Wirkung wurde das Gen CD44 gewählt. Von ihm ist bekannt, dass es in Neuroblastomzellen hypermethyliert ist und durch DNS-Demethylierung mit 5-Aza-dC reexprimiert werden kann (Tang, Robinson et al. 2004). In LAN1 WT Zellen konnte die CD44-Expression dosisabhängig durch die 5-Aza-dC-Behandlung wiederhergestellt werden. Die Behandlung mit 5 µM steigerte die Expression auf das 5fache (Abbildung 10).

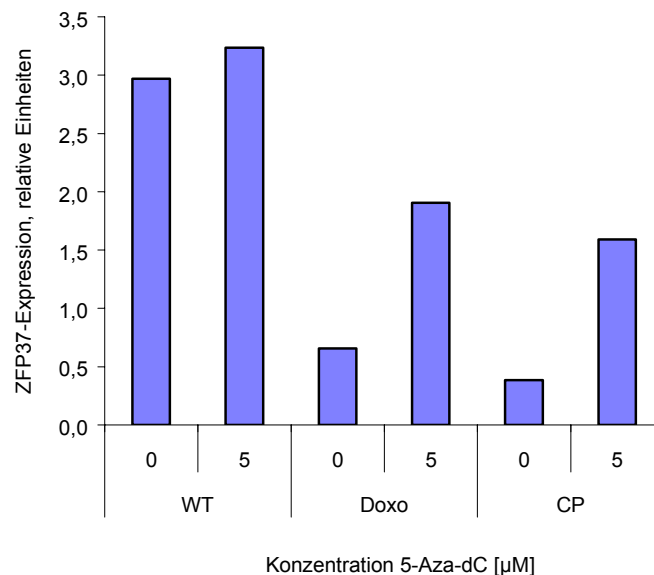


**Abbildung 10:** In LAN1 WT-Zellen wurde die Expression von CD44 durch DNS-Demethylierung mit 5-Aza-dC dosisabhängig gesteigert. Bei einer Konzentration von 5 µM erhöhte sie sich auf das 5fache (repräsentative Darstellung des Ergebnisses einer 4fach durchgeführten semiquantitativen PCR Analyse mit GAPDH als internem Standard, densitometrische Auswertung).

Da das Verhältnis aus demethylierender Wirkung und Überlebensrate der Zellen bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  5-Aza-dC am günstigsten war, wurde diese Konzentration für die folgenden Experimente mit ZFP37 beibehalten.

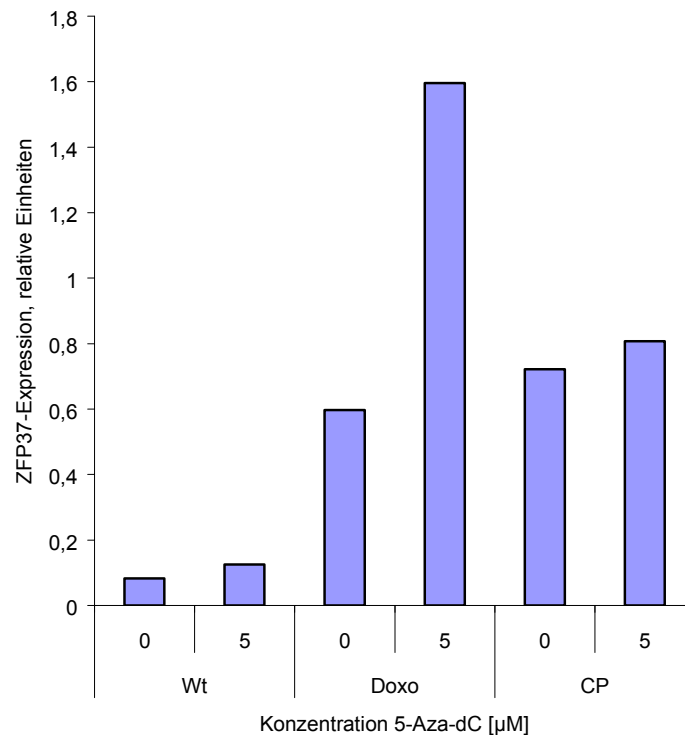
### Analyse der Auswirkungen der DNS-Demethylierung auf die ZFP37-Expression in Neuroblastom-Zelllinien

Wurden LAN1 Zellen für 4 Tage mit 5  $\mu\text{M}$  5-Aza-dC behandelt, zeigte die semiquantitative PCR mit GAPDH als Referenzgen, dass ZFP37 durch die Demethylierung reexprimiert wurde (Abbildung 11). Die ZFP37-Expression erhöhte sich in den Doxo<sup>R</sup> und CP<sup>R</sup> Zellen fast um das 4fache und in den LAN1 WT Zellen leicht.



**Abbildung 11: Semiquantitative PCR Analyse der ZFP37-Expression in LAN1 Zellen nach DNS-Demethylierung durch 5-Aza-dC.** Die 5-Aza-dC-Behandlung steigerte die ZFP37-Expression in den WT und resistenten Zellen (repräsentative Darstellung des Ergebnisses einer 3fach durchgeführten Analyse mit GAPDH als internem Standard, densitometrische Auswertung).

Auch in Kelly Doxo<sup>R</sup> Zellen ließ sich die ZFP37-Expression durch DNS-Demethylierung wiederherstellen, in WT und Cisplatin-resistenten Zellen stieg die Expression nach Demethylierung leicht (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Repräsentative Darstellung des Ergebnisses einer 3fach durchgeführten semiquantitativen PCR (densitometrische Auswertung) mit ZFP37 in Kelly Zellen, mit GAPDH als internem Standard, nach DNS-Demethylierung mit 5-Aza-dC: moderate Expressionssteigerung im WT und in CP<sup>R</sup> Zellen, in Doxo<sup>R</sup> Zellen verdoppelte sich die Expression.**

Diese Analysen zeigten, dass die Expression von ZFP37 durch Hypermethylierung epigenetisch reguliert war.

In dieser Arbeit wurde ebenso untersucht, ob in primären Neuroblastomen die verminderte Expression des Kandidatengens IGSF4 epigenetisch durch Hypermethylierung der DNS reguliert ist. Da für IGSF4 bereits gezeigt wurde, dass das Gen nach Behandlung von NB Zelllinien mit demethylierenden Agenzien reexprimiert wird (Michels, Hoebeeck et al. 2008), und eine Zielsequenz für DNS-Hypermethylierungen in der Promotorregion des Gens bekannt ist, wurde das Methylierungsmuster dieses DNS-Abschnitts direkt mit Hilfe der Bisulfit Sequenzierungsmethode in primären Neuroblastomen untersucht (s. 4.3.3.2).

#### 4.3.3.2 Analyse des DNS-Methylierungsmusters durch Bisulfit-Sequenzierung

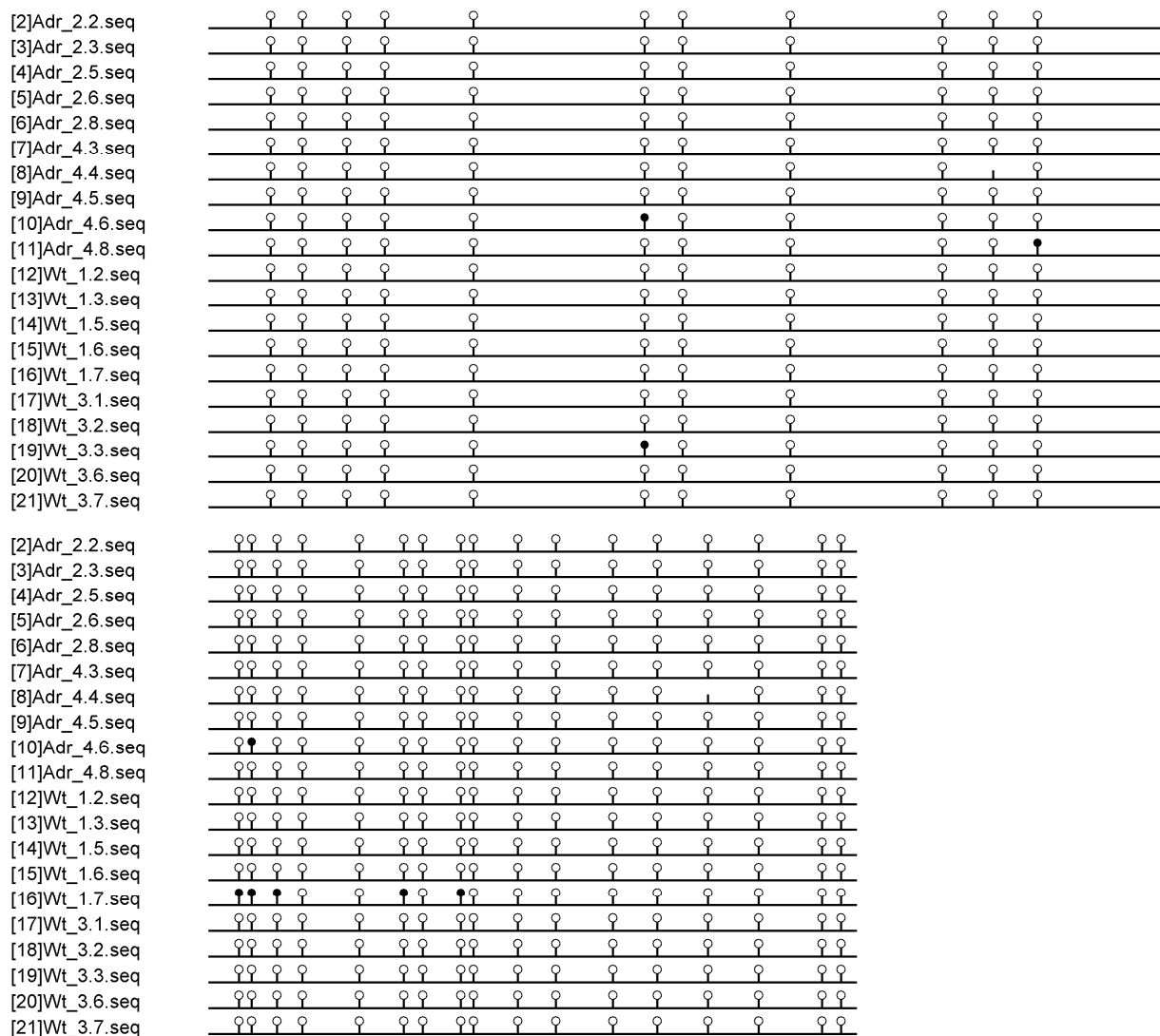
Für ZFP37 ist bisher keine definierte Promotorregion bekannt, die gezielt auf eine Hypermethylierung untersucht werden könnte. Es wurden daher in dieser Arbeit drei Abschnitte aus den CpG-Inseln des ZFP37-Gens analysiert. Die CpG-Inseln mussten mindestens 100 bp umfassen, der GC Gehalt sollte größer als 50% sein und das Verhältnis aus vorgefundenen zu erwarteten CpGs größer als 0.6 (definiert in der methPrimerDB Datenbank nach (Li and Dahiya 2002)).

Das DNS-Fragment des ZFP37-Gens, das laut DMH-Analyse in Doxorubicin-resistenten LAN1 Zellen hypermethyliert sein sollte, wurde durch eine Bisulfit-Sequenzierung näher untersucht (vgl. 3.2.17). Die Sequenz umfasste das erste Exon von ZFP37, grenzte an CGI-2 (s. Abbildung 13) und enthielt 28 CpGs.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der kodierenden Sequenzen (CDS), CpG Inseln, mittels COBRA (CGI) und Bisulfit-Sequenzierung analysierten Sequenzen des ZFP37-Gens**

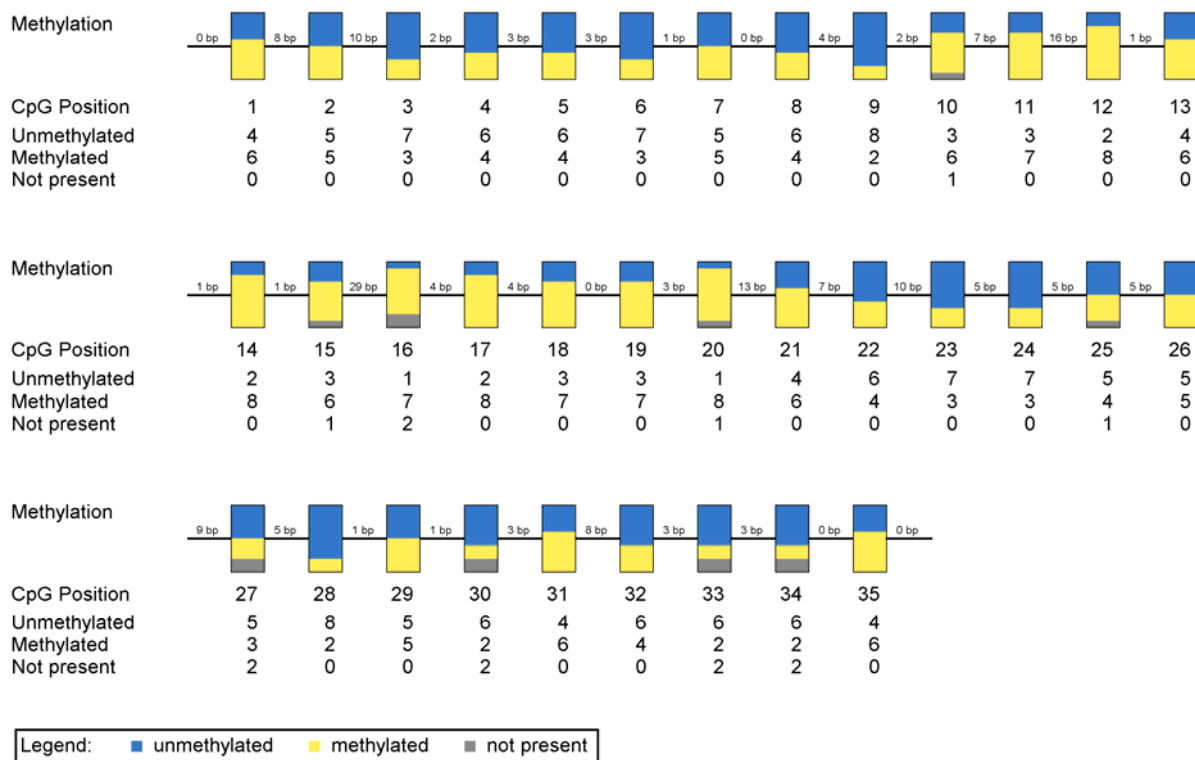
Die PCR-Amplifikation der Bisulfit-DNS aus Wildtypzellen und exemplarisch aus Doxorubicin-resistenten Zellen erfolgte mit den ZFP37 BS-Primern (vgl. 3.1.3). Die Sequenzierung von jeweils zehn Klonen ergab, dass in den Doxorubicin-resistenten Zellen (Adr) ein Klon (Adr\_4.6.seq) am 6. und 13., ein weiterer Klon (Adr\_4.8.seq) am 11. CpG methyliert war (Abbildung 14). In den chemotherapiesensitiven Zellen wies ein Klon (Wt\_1.7.seq) Methylierungen des Cytosins in den CpGs 12-14, 17 und 19 auf, ein anderer Klon (Wt\_3.3.seq) in CpG Nummer 6. Alle anderen CpGs in den untersuchten Klonen besaßen unmethylierte CpGs. Somit zeigten die Doxorubicin-resistenten und Wildtypzellen zwar Unterschiede im Methylierungsmuster dieser untersuchten Sequenz, vermutlich ist die abweichende Methylierung in den resistenten Zellen jedoch nicht hinreichend für eine transkriptionelle Repression von ZFP37.



**Abbildung 14: DNS-Methylierungsmuster der auf dem DMH-Chip befindlichen Sequenz in resistenten und sensitiven Zellen.** Die gefüllten Kreise entsprechen methylierten Cytosinen, die ungefüllten, weißen Kreise entsprechen unmethylierten Cytosinen eines CpGs, und vertikale Linien ohne Kreis stellen ein CpG in der genomischen Sequenz dar, welches bei der Bisulfit-Sequenzierung nicht als solches erhalten geblieben war. Von zehn analysierten Proben waren in den Doxorubicin-resistenten Zellen (Adr) nur 2 Klone am 6. und 13., bzw. 11. CpG methyliert. Ein Wildtyp-Klon zeigte ein methyliertes CpG an Position 6, ein weiterer Klon an Position 12-14, 17 und 19.

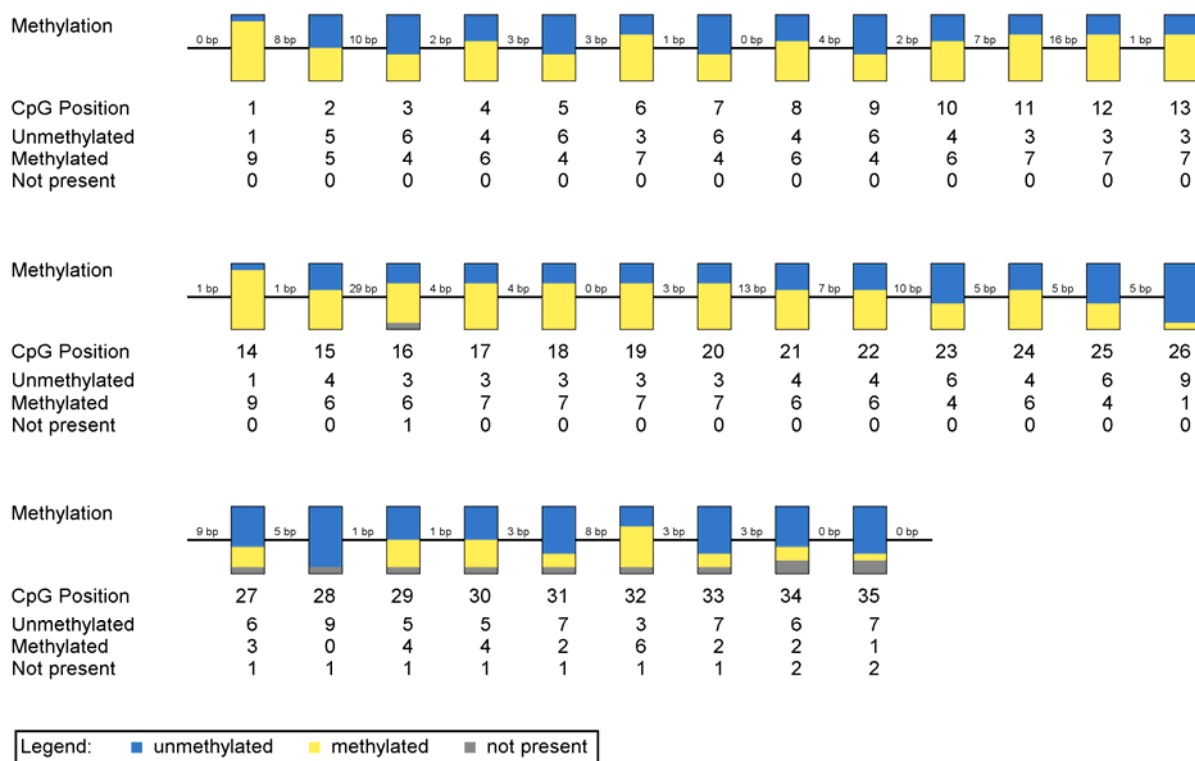
Ein Teil der DNS-Sequenz der CpG-Insel CGI-1 (s. 4.3.3.3), die zusätzlich mit Hilfe der COBRA untersucht wurde und DNS-Methylierungen in resistenten und sensitiven Zellen aufwies, wurde ebenfalls durch Bisulfit-Sequenzierung analysiert, um eine detailliertere Aussage über den Methylierungsgrad der einzelnen CpGs treffen zu können. Für die Amplifikation der Bisulfit-DNS aus Doxorubicin-resistenten Zellen und Wildtypzellen wurden die Primer ZFP37 CGI-1 verwendet (vgl. 3.1.4). Die Auswertung der Bisulfit-

Sequenzierung von jeweils zehn Klonen zeigte, dass sowohl in den Wildtypzellen (s. Abbildung 15) als auch in den Doxorubicin-resistenten Zellen (s. Abbildung 16) alle CpGs mehr oder weniger stark methyliert waren. Eine Ausnahme stellte das gänzlich unmethylierte CpG 28 in den resistenten Zellen dar. Der Vergleich des Methylierungsmusters der sensitiven und resistenten Zellen zeigte, dass die CpGs Nummer 1, 4, 6, 8, 9, 22, 24 und 32 in den Doxorubicin-resistenten Zellen mindestens 20% stärker methyliert waren als das entsprechende CpG in den Wildtypzellen. Dagegen waren die CpGs 26, 31 und 35 in den sensitiven Zellen mindestens 20% stärker methyliert als in den resistenten Zellen. Die übrigen analysierten CpGs wiesen einen ähnlichen Methylierungsgrad auf.



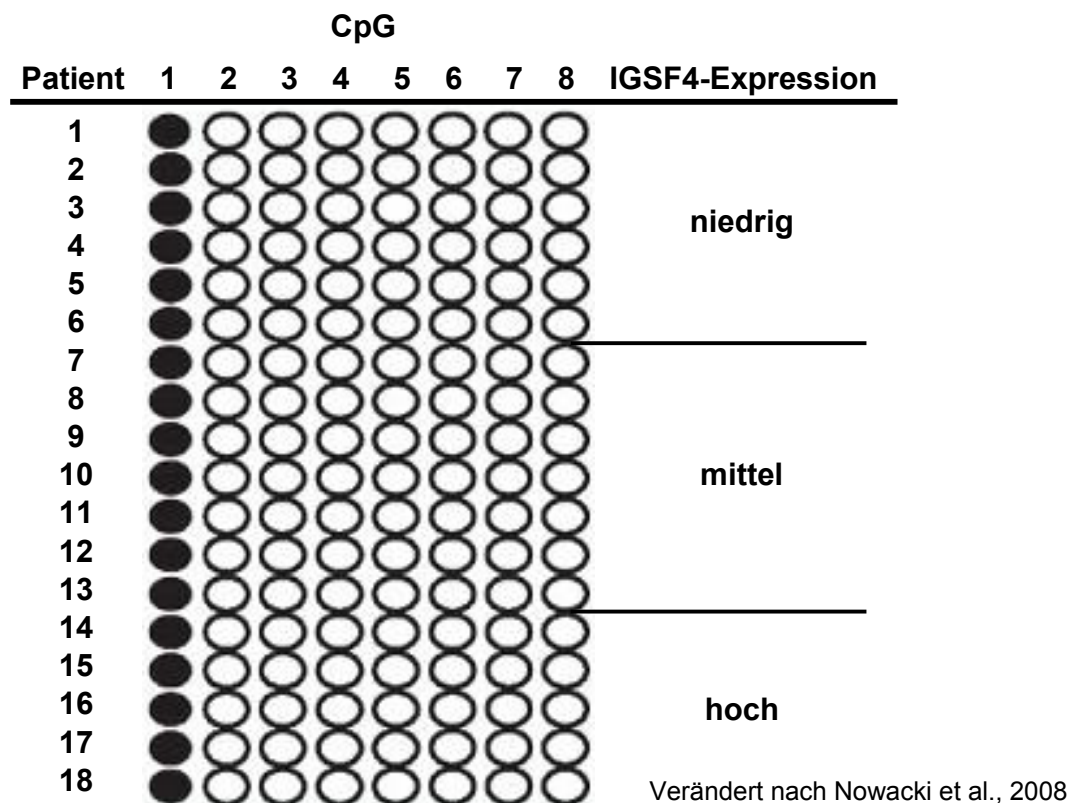
**Abbildung 15: Auswertung des Methylierungsgrades der einzelnen CpGs in CGI-1 (vgl. 4.3.3.3) in LAN1 WT Zellen durch Bisulfit-Sequenzierungsanalyse von zehn Klonen**





**Abbildung 16: Auswertung des Methylierungsgrades der einzelnen CpGs in CGI-1 (vgl. 4.3.3.3) in LAN1 Doxo<sup>R</sup> Zellen durch Bisulfit-Sequenzierungsanalyse von zehn Klonen**

Von IGSF4 ist bekannt, dass acht CpGs in der Promotorregion dieses Gens in verschiedenen Tumorarten hypermethyliert sind im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe (Fukami, Fukuhara et al. 2003) (Steenbergen, Kramer et al. 2004). Mit Hilfe der Bisulfitsequenzierungs-Analyse wurde überprüft, ob die Promotorregion auch in primären Neuroblastomen eine Hypermethylierung aufweist und damit zu der verminderten IGSF4-Expression führt. Die zu analysierenden DNS-Stellen und die verwendeten Primer wurden anhand der publizierten Sequenz gewählt (Steenbergen, Kramer et al. 2004). Es wurden Tumorproben aus 18 Patienten mit unterschiedlichen Expressionsgraden an IGSF4 untersucht: 5 Proben mit hoher Expression, 7 mit mittlerer Expression und 6 Proben mit niedriger Expression. Betrug die IGSF4-Expression mehr als 75% der durchschnittlichen Expression, war sie als hoch definiert, bei mehr als 25 bis 75% als mittel und bis 25% als niedrig. Die Bisulfitsequenzierungs-Analyse ergab, dass das DNS-Methylierungsmuster der Promotorregion in allen untersuchten Proben gleich war, unabhängig von der IGSF4-Expression (vgl. Abbildung 17). Die Reduktion des Expressionsgrades wurde somit nicht durch eine Hypermethylierung der Promotorregion induziert.



**Abbildung 17:** Darstellung des Methylierungsgrades der CpGs in der Promotorregion von IGSF4 in Abhängigkeit zur Expressionshöhe des Gens analysiert durch Bisulfit-Sequenzierung. Die gefüllten Kreise entsprechen methylierten, die weißen Kreise unmethylierten Cytosinen eines CpGs. Eine Expression <25% der durchschnittlichen Expression war als niedrig definiert, >25 und <75% als mittel, >75% als hoch, analysiert mit Hilfe der Oligonukleotid-Microarray Technologie. Unabhängig von der Expression des Gens war in den untersuchten Tumorproben nur das erste CpG methyliert, die anderen waren unmethyliert. Die divergente Expression von IGSF4 war demnach nicht in einer Hypermethylierung dieser Promotorregion begründet.

#### 4.3.3.3 Analyse der Methylierung der ZFP37-Genregion durch COBRA

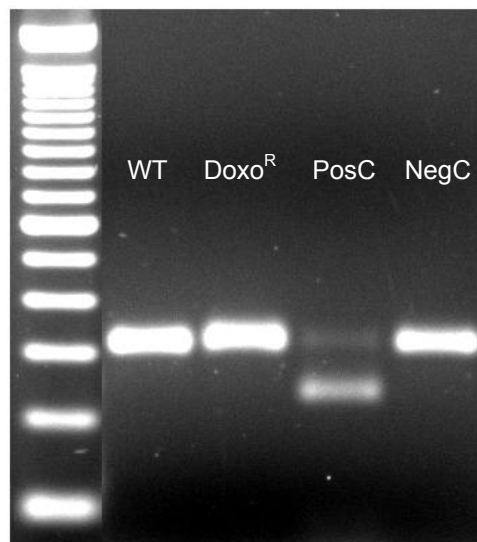
Es wurden in dieser Arbeit drei Abschnitte aus den CpG-Inseln des ZFP37-Gens analysiert: Die COBRA-analyisierte Sequenz der ersten CpG-Insel (CGI-1) liegt 3510 bp vor dem ersten Exon, CGI-2 liegt in einer CpG-Insel, die das erste Exons umfaßt und CGI-3 liegt zwischen dem dritten und vierten Exon des Gens (Abbildung 13). CGI-1 hat eine TaqI und drei BstUI Schnittstellen, CGI-2 hat zwei TaqI und eine BstUI Schnittstelle und CGI-3 zwei TaqI Schnittstellen.

Die COBRA mit der durch PCR amplifizierten DNS wurde wie in 3.2.18 beschrieben durchgeführt. Als Negativkontrolle für den Verdau diente *in vitro* mit 5-Aza-dC demethylierte DNS, als Positivkontrolle wurde zuvor mit SssI methylierte DNS, welche

durch die Enzyme verdaut werden konnte, verwendet. Durch TaqI wurde die amplifizierte Sequenz aus CGI-1 in den LAN1 und Kelly WT, Doxo<sup>R</sup> und CP<sup>R</sup> Zellen verdaut, die Ausgangsbande des PCR-Produkts blieb jedoch auf dem Agarose-Gel zusätzlich erhalten. Dies wies auf eine teilweise Methylierung der DNS hin. Der Methylierungsgrad der einzelnen Sublinien konnte mit dieser Analyse nicht unterschieden werden. Die Bisulfit-Sequenzierung des CpGs Nummer 14 (vgl. 4.3.3.2) zeigte jedoch, dass es in acht von zehn Klonen des LAN1 Wildtyps und neun von zehn Klonen der Doxo<sup>R</sup> Zellen methyliert war.

Der BstUI-Verdau der methylierten CGI-1-Sequenz erzeugte eine Vielzahl von Banden, da die Erkennungsequenz für das Enzym in dieser Sequenz dreimal vorkam. Die analysierten Sequenzen waren teilweise methyliert, eine Differenz zwischen den resistenten und sensitiven Sublinien im Grad der Methylierung war nicht erkennbar. CGI-1 war also in resistenten und sensitiven Zellen teilweise methyliert, ohne dass diese Methylierung eine Abweichung in der Expression erklären könnte.

Der TaqI-Verdau der CGI-2 zeigte, dass weder die DNS aus den LAN1 WT-Zellen, noch aus den exemplarisch untersuchten Doxo<sup>R</sup> Zellen verdaut werden konnte (Abbildung 18). Die Erkennungssequenzen für TaqI waren somit in den sensitiven und resistenten Zellen nicht methyliert.



**Abbildung 18:** Die COBRA mit TaqI zeigte, dass die Erkennungssequenz für dieses Enzym in CGI-2 weder im WT noch in den Doxo<sup>R</sup> Zellen methyliert war. Als Negativkontrolle diente *in vitro* demethylierte DNS (NegC), als Positivkontrolle mit SssI methylierte DNS (PosC).

Die COBRA Analyse der BstUI Erkennungssequenz in CGI-2 ergab, dass auch diese in den WT und Doxo<sup>R</sup> Zellen unmethyliert war.

Wenn CGI-3 durch TaqI an beiden möglichen Schnittstellen geschnitten wird, entstehen ein 109, ein 88 und ein 29 bp langes Segment. Wie in Abbildung 19 dargestellt, wurden die PCR Amplifikate der WT und der Doxo<sup>R</sup> Zellen komplett verdaut. Die Analyse zeigte, dass die so analysierten CpGs der 3. CpG-Insel in den resistenten und sensitiven Zellen gleichermaßen methyliert waren.

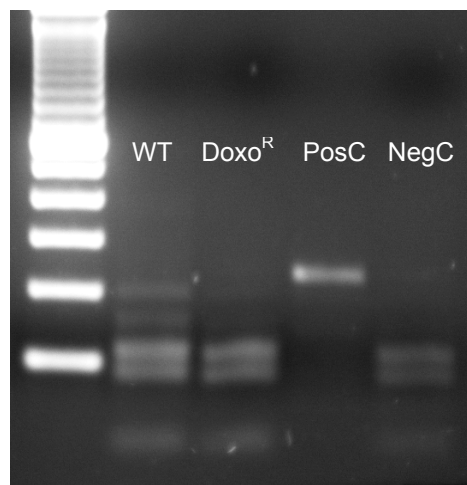
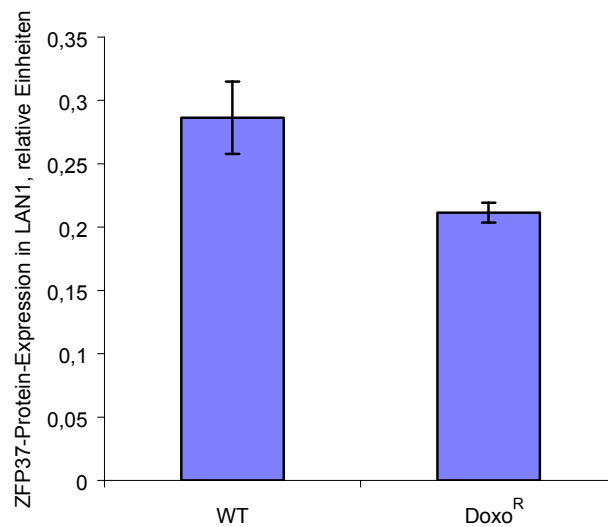


Abbildung 19: COBRA der CGI-3 Sequenz mit TaqI: Die analysierten CpGs waren im WT (Wildtyp) und in den Doxo<sup>R</sup> (Doxorubicin-resistenten) Zellen methyliert.

## 4.4 Funktionelle Analysen der ZFP37-Regulation in resistenten Neuroblastomzelllinien

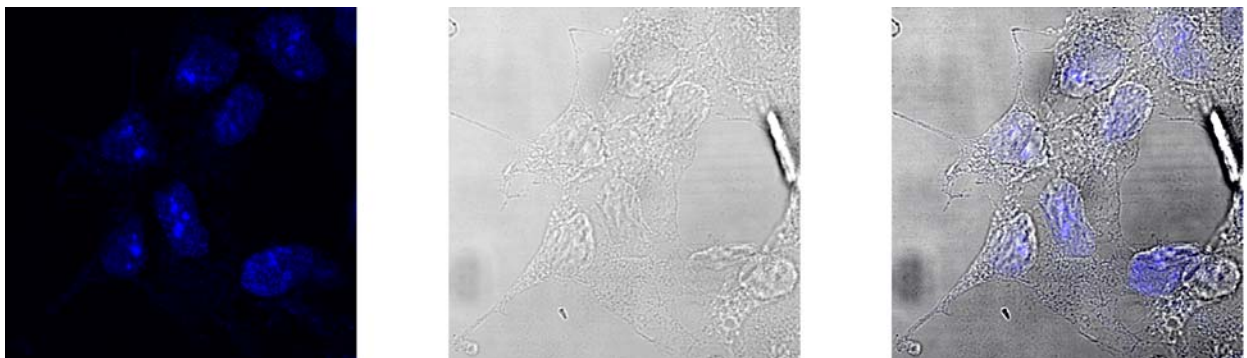
### 4.4.1 Analyse der Expression und subzellulären Verteilung des ZFP37-Proteins in resistenten versus sensitiven Zellen

Zur Analyse der ZFP37-Proteinexpression in resistenten versus sensitiven Zellen wurde exemplarisch ein Western-Blot mit LAN1 WT und LAN1 Doxo<sup>R</sup>-Zellen durchgeführt. Der Western-Blot zeigt, dass die Expression in den Doxorubicin-resistenten Zellen deutlich niedriger war als in den therapiesensitiven Zellen (Abbildung 20). Dies entspricht der gemessenen verminderten RNS-Expression in den resistenten Zellen (vgl. 4.3.1).

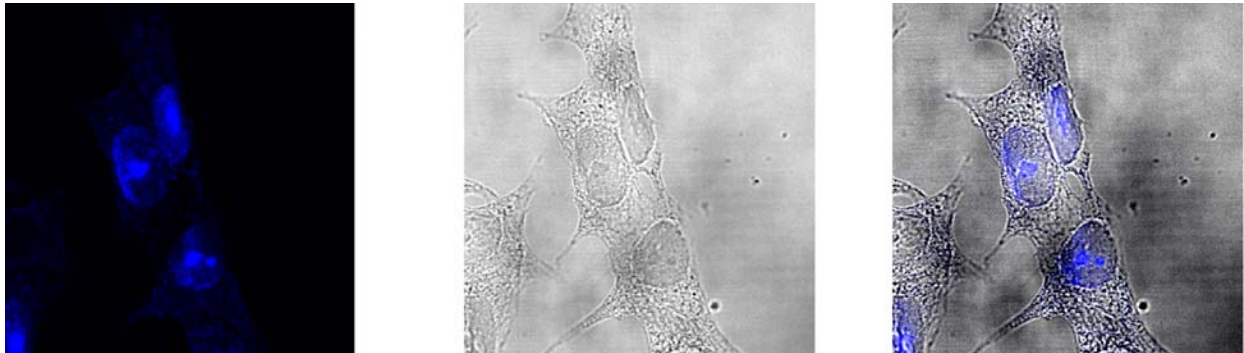


**Abbildung 20:** Die densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analyse zeigte eine verminderte ZFP37-Proteinexpression in Doxorubicin-resistenten LAN1 Zellen (Doxo<sup>R</sup>) im Vergleich zu den Wildtypzellen (WT), normalisiert mit  $\beta$ -Aktin als internem Standard (ZFP37-Antikörper 1:250,  $\beta$ -Aktin-Antikörper 1:2000, Anti-Maus-Zweitantikörper 1:1000 verdünnt).

Unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers konnte die Expression des ZFP37-Proteins (vgl. 3.2.16) in LAN1 WT und Doxorubicin-resistenten Zellen mit Hilfe des Konfokalmikroskops analysiert werden. Die Zellaufnahmen zeigten, dass sich das Protein in sensiblen (s. Abbildung 21) und resistenten Zellen (s. Abbildung 22) v.a. im Zellkern befand. In den resistenten Zellen war es darüber hinaus im Cytosol detektierbar (nach Cy5-Färbung blau dargestellt).



**Abbildung 21:** In LAN1 Wildtypzellen ist das ZFP37-Protein (blau) vor allem im Zellkern lokalisiert (ZFP37-Antikörper 1:100, Cy-5 markierter Anti-Maus-Zweitantikörper 1:800 verdünnt).

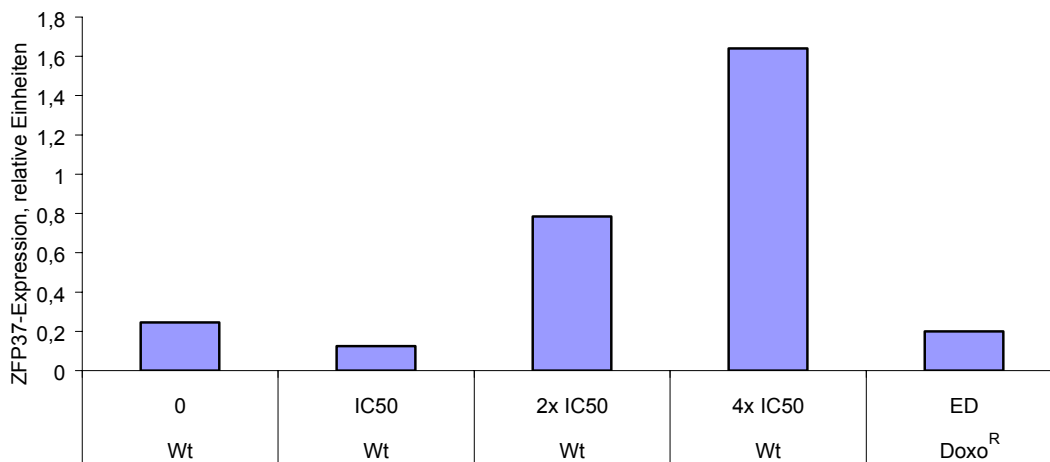


**Abbildung 22:** In den LAN1 Doxo<sup>R</sup> Zellen befand sich das ZFP37-Protein (blau) ebenfalls v.a. im Zellkern. Darüber hinaus war eine leichte Färbung des Cytosols sichtbar (ZFP37-Antikörper 1:100, Cy-5 markierter Anti-Maus-Zweitantikörper 1:800 verdünnt).

#### **4.4.2 Analyse des Zusammenhangs zwischen der Zytostatikum-Inkubation und der ZFP37-Expression**

Um zu testen, ob sich die ZFP37-Expression durch die Inkubation der Zellen mit dem Zytostatikum ändert, wurden LAN1 WT Zellen für 3 Tage mit ihrer IC<sub>50</sub>, der 2fachen IC<sub>50</sub> und ihrer 4fachen IC<sub>50</sub> Doxorubicin inkubiert. Das Gesamtprotein der Zellen wurde mittels Western-Blot analysiert. Um die Expression in behandelten und unbehandelten WT Zellen und in Doxo<sup>R</sup> Zellen vergleichen zu können, wurde die Expression jeweils mit  $\beta$ -Aktin als internem Standard normalisiert.

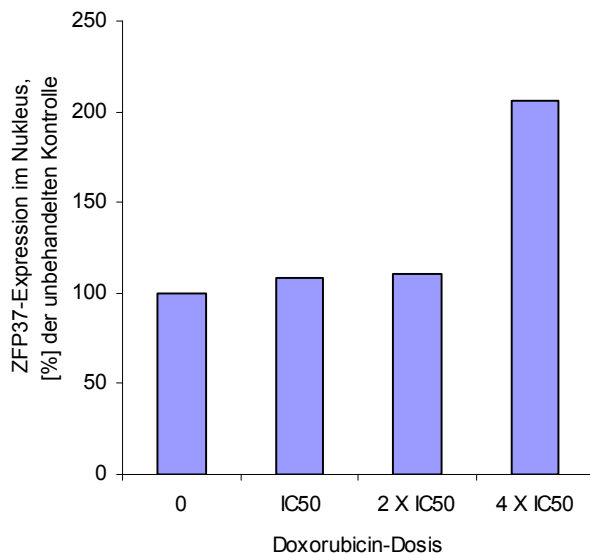
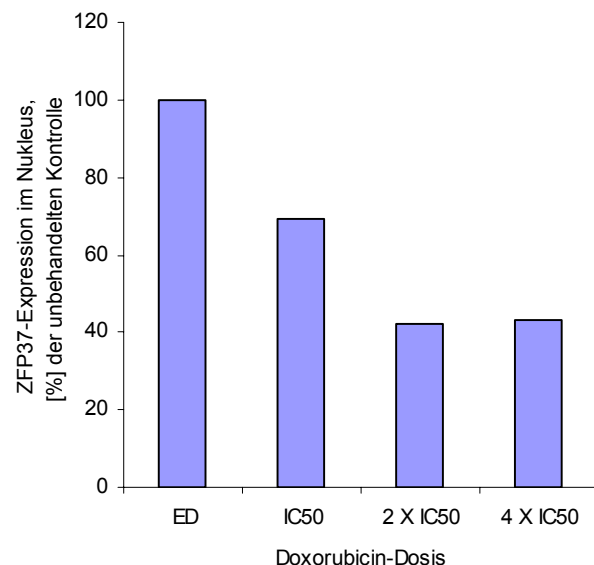
Die Inkubation mit der 2fachen und 4fachen IC<sub>50</sub> Doxorubicin ließ die Proteinexpression auf das 4fache bzw. 8fache ansteigen im Vergleich zur Expression in unbehandelten WT Zellen und in LAN1 Doxo<sup>R</sup> Zellen, die mit ihrer Erhaltungsdosis inkubiert wurden (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Die ZFP37-Expression im LAN1 WT stieg dosisabhängig unter Behandlung mit Doxorubicin an (normalisiert mit  $\beta$ -Aktin als internem Standard, Bestimmung mittels densitometrischer Auswertung des Western-Blots: ZFP37-Antikörper 1:250,  $\beta$ -Aktin-Antikörper 1:2000, Anti-Maus-Zweitantikörper 1:1000 verdünnt; ED = Erhaltungsdosis Doxorubicin).**

Um eingehender zu untersuchen wie sich mit der Inkubation der Zellen mit einem Zytostatikum die Expression von ZFP37 ändert, wurden Western-Blots mit cytosolischen Proteinextrakten (CE) und Kernextrakten (KE) durchgeführt. LAN1 WT und Doxo<sup>R</sup> Zellen wurden dazu erneut für 3 Tage mit der 1fachen, 2fachen oder 4fachen IC<sub>50</sub> Doxorubicin inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, bzw. mit der Erhaltungsdosis Doxorubicin inkubierte Zellen. Die ZFP37-Expression in den KE wurde mit Histon H3 als internem Standard normalisiert.

Der Western-Blot zeigte, dass unter Zytostatikum-Inkubation der Proteingehalt in LAN1 WT Zellen im Zellkern auf die 2fache Menge anstieg (Abbildung 24 a). Es wurde der Mittelwert aus vier Analysen gebildet, die jeweils unterschiedliche Fehlerraten hatten. Die ZFP37-Proteinexpression in Doxo<sup>R</sup> LAN1 Zellen sank im Zellkern auf die Hälfte unter Inkubation mit steigenden Dosen Doxorubicin. Als Referenz galten die Zellen, die mit ihrer Erhaltungsdosis Doxorubicin inkubiert wurden (Abbildung 24 b).

**a) LAN1 WT****b) LAN1 Doxo<sup>R</sup>**

**Abbildung 24:** Mittelwerte der densitometrischen Auswertung eines 4fach durchgeführten Western-Blots mit Kernextrakten, normalisiert mit Histon H3 als internem Standard: a) In LAN1 WT Zellen erhöhte sich die ZFP37-Proteinexpression im Nukleus dosisabhängig durch Inkubation mit steigenden Dosen Doxorubicin. Nach Inkubation mit der 4fachen IC50 stieg sie auf das Doppelte an. b) Die ZFP37-Proteinexpression in Doxo<sup>R</sup> LAN1-Zellen sank im Zellkern auf die Hälfte bei der Behandlung der Zellen mit der 4fachen IC50. (ZFP37-Antikörper 1:250, Anti-Maus-Zweitantikörper 1:1000 verdünnt, Histon H3-Antikörper 1:500, Anti-Kaninchen-Zweitantikörper 1:500 verdünnt; WT = Wildtyp, Doxo<sup>R</sup> = Doxorubicin-resistente Zellen, ED = Erhaltungsdosis Doxorubicin).

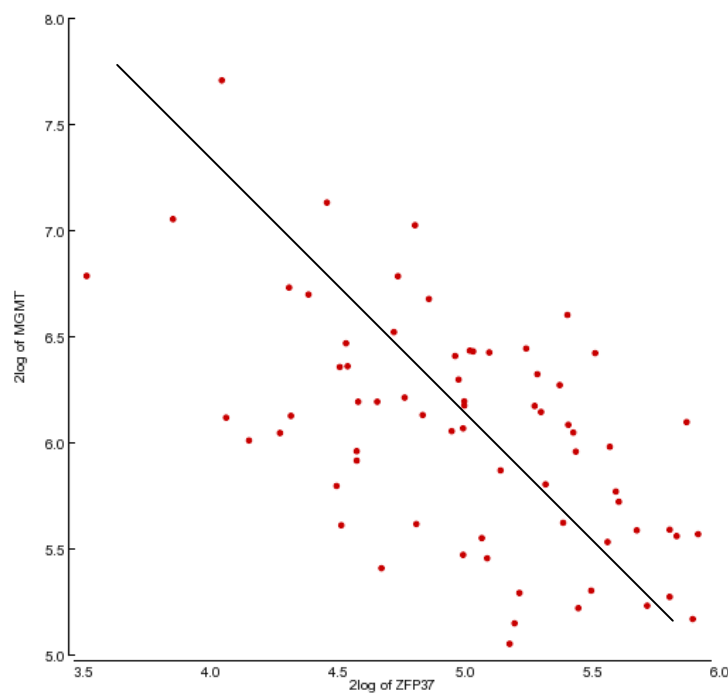
#### 4.4.3 Analyse der Korrelation zwischen der ZFP37 Expression und Resistenzfaktoren in primären Neuroblastomen

Um weitere Informationen über die Beteiligung von ZFP37 an der Resistenzentwicklung zu erhalten, wurden genomweite Expressionsdaten von primären NB reanalysiert. Dabei wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt, um mit ZFP37 korrelierende, bzw. invers korrelierende Gene zu finden. In den resultierenden Genlisten wurde dann nach chemoresistenzmodulierenden Genen gesucht. Dazu wurde die Genexpression in 69 Tumorproben aus 68 Neuroblastompatienten mit Hilfe der Microarray-Methode ermittelt und mit der ZFP37-Expression verglichen (s. 3.2.10).

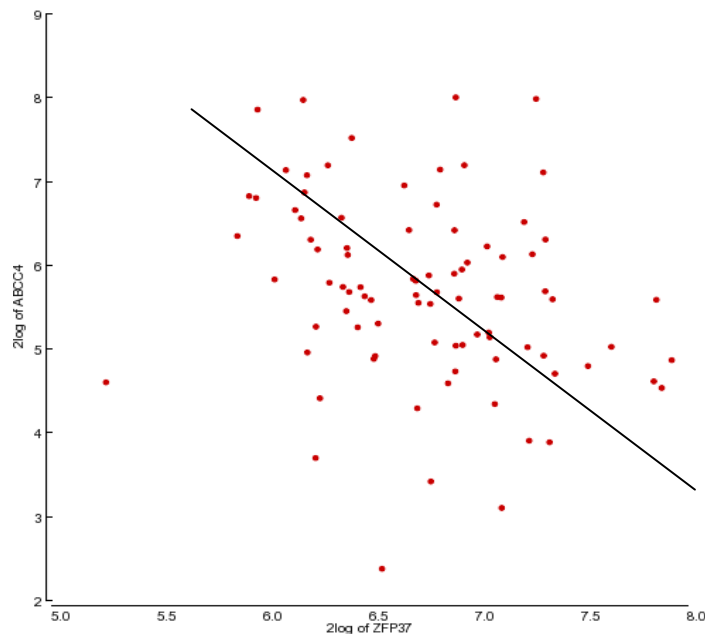
Für zwei Gene, MGMT (Abbildung 25) und ABCC4 (Abbildung 26), die an der Resistenzentwicklung in Neuroblastomen beteiligt sind, wurde durch den Abgleich der logarithmierten Expressionsdaten eine inverse Korrelation mit ZFP37 gefunden. Die Proteinmethylguanin-DNS-Methyltransferase MGMT codiert ein DNS-Reparatur Enzym, das Alkylierungen an der O6-Position von Guanin aufhebt. Hierdurch ist es mit der



Resistenz gegen alkylierende Zytostatika wie Temozolomid assoziiert (Hegi, Diserens et al. 2004). MGMT wird in unterschiedlichen Tumorentitäten abweichend exprimiert, wobei eine Hypermethylierung der Promotorregion mit einer verminderten Expression einhergeht (Gerson 2002). Die inverse Korrelation zwischen ZFP37 und ABCC4 bestätigte sich zudem in einer unabhängigen Kohorte von 88 primären Neuroblastomen (Abbildung 26) (die Daten wurden freundlicherweise von R. Versteeg, AMC, Universität Amsterdam zur Verfügung gestellt). ABCC4 („ATP-binding cassette, subfamily C, member 4“) oder MRP4 gehört zur Familie der „multidrug resistance-associated protein“ Transportproteine und ist in primären Neuroblastomen mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert (Norris, Smith et al. 2005).



**Abbildung 25: Inverse Korrelation zwischen der logarithmierten ZFP37- und MGMT-Expression in 69 Tumorproben aus primären Neuroblastomen.**



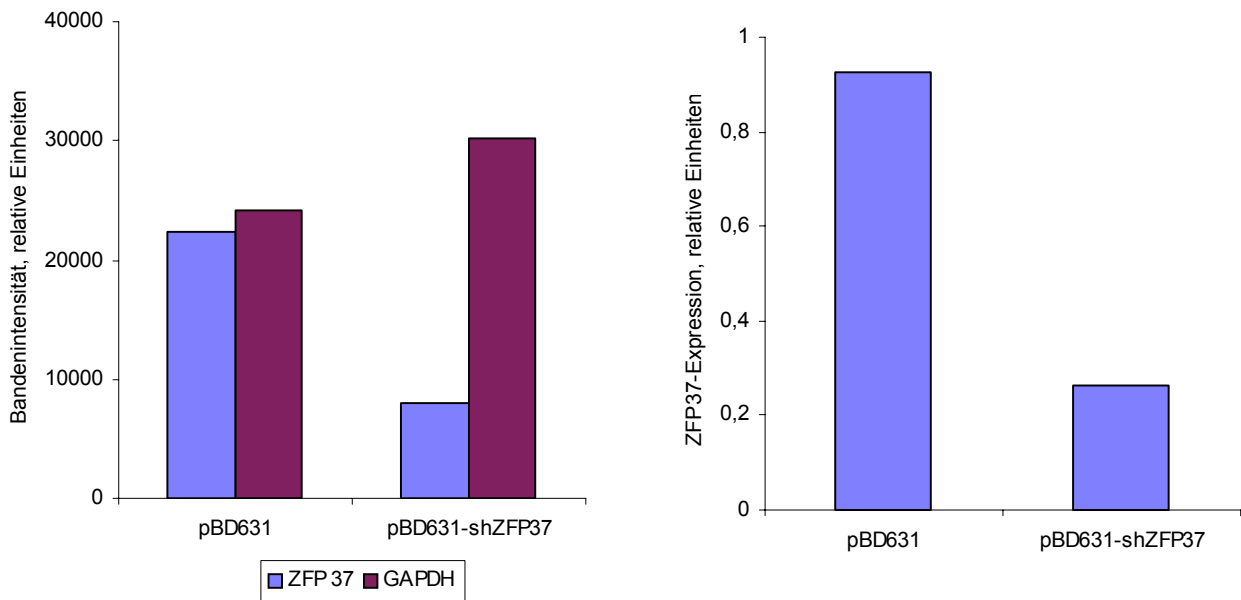
**Abbildung 26: Inverse Korrelation zwischen der logarithmierten ZFP37- und ABCC4-Expression in 88 primären Neuroblastomen.**

Für MGMT bestätigte sich in dieser Kohorte der Trend für die inverse Korrelation zu ZFP37.

#### **4.4.4 Regulation von Resistenzgenen nach Modulation der ZFP37-Expression**

Um einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen einer verminderten ZFP37-Expression und einer erhöhten MGMT-, bzw. ABCC4-Expression (vgl. 4.4.3) zu überprüfen, wurde die ZFP37-Expression in LAN1 Wildtypzellen durch shRNS-Transformation *in vitro* herunterreguliert. Die shZFP37-Transfektion bewirkte im Zellpool aus transfizierten Zellen (pBD631-shZFP37) eine 4fache Verminderung der Genexpression im Vergleich zur Vektorkontrolle pBD631. Die Herunterregulation wurde

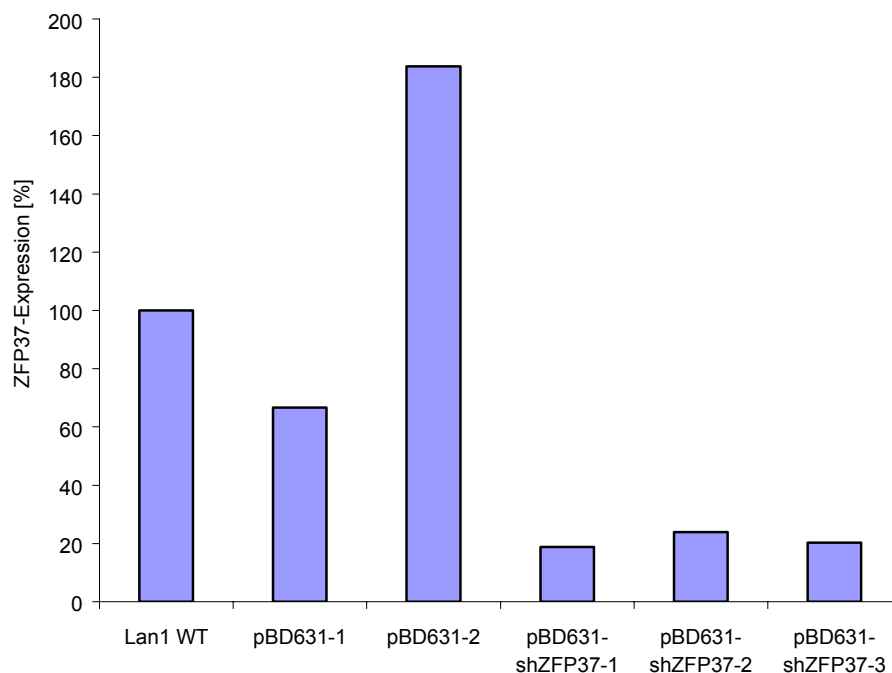
durch semiquantitative PCR mit GAPDH als internem Standard (s. Abbildung 27) gemessen.



**Abbildung 27:** Durch Transfektion von LAN1 Zellen mit ZFP37-shRNS wurde die ZFP37-Expression in den pBD631-shZFP37 Zellen um das 4fache im Vergleich zur Leervektorkontrolle pBD631 vermindert. Die Expression wurde durch semiquantitative PCR bestimmt und nach densitometrischer Auswertung gegen die GAPDH-Expression normalisiert.

Für weitere Analysen wurden drei Einzelklone mit verminderter ZFP37-Expression durch shRNS-Transfektion gezüchtet (pBD631-ZFP37-1, -2 und -3) sowie zwei Leervektorkontrollen (pBD631-1 und -2). Durch die Transfektion konnte die ZFP37-Expression in den Einzelklonen auf etwa 20% im Vergleich zur Expression im Wildtyp reduziert werden (s.

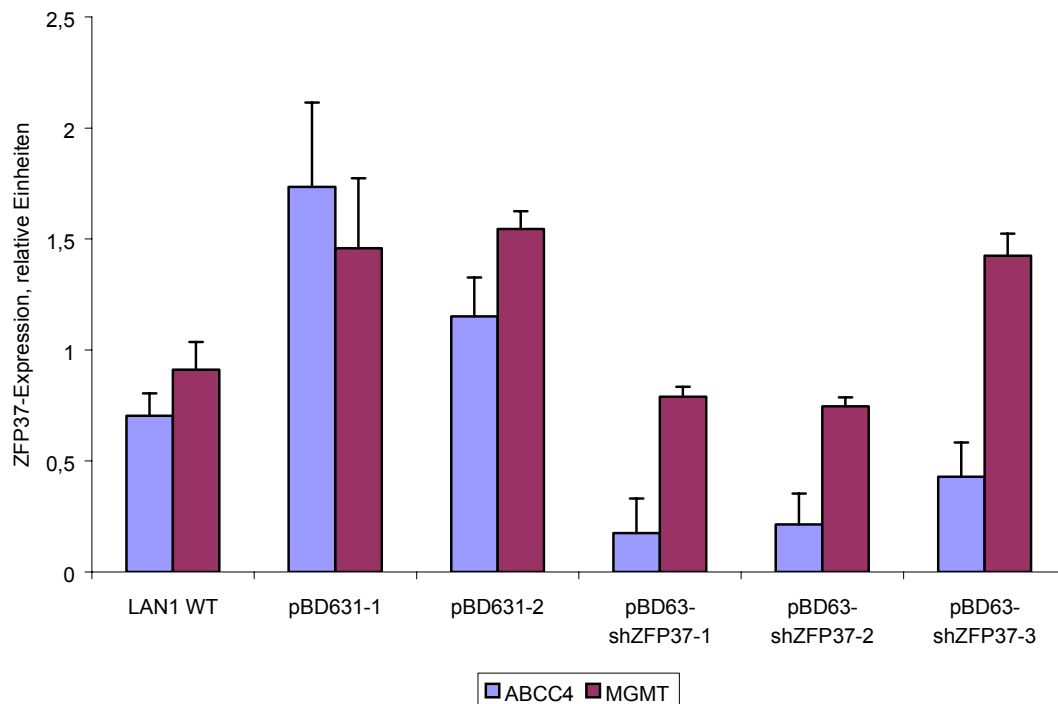
Abbildung 28). Die Genexpression wurde durch Real-Time PCR bestimmt (vgl. 3.2.9).



**Abbildung 28:** Durch shRNS-Transfektion konnte die ZFP37-Expression in den von LAN-1 Zellen abgeleitete Einzellklonen pBD631-shZFP37-1, -2 und -3 auf etwa 20% im Vergleich zum Wildtyp gesenkt werden, gemessen mittels Real-Time PCR, normalisiert mit GAPDH

### **Analyse der ABCC4- und MGMT-Expression in Zellen mit verminderter ZFP37-Expression**

In den mit ZFP37-shRNS stabil transfizierten Zellklonen und Leervektorkontrollen sowie im Wildtyp wurde die ABCC4- und MGMT-Expression mittels Real-Time PCR bestimmt, um die inverse Korrelation zur ZFP37-Expression im Zellkulturmodell zu überprüfen. Wie Abbildung 29 zeigt, konnte der Zusammenhang der Genexpression in primären Neuroblastomen zwischen ZFP37 und ABCC4 nicht bestätigt werden. Die ABCC4-Expression stieg nach der ZFP37 Herunterregulation im Vergleich zur Leervektorkontrolle pBD631-1 und -2 nicht an. Die MGMT-Expression unterlag im Zellkulturmodell keinen signifikanten Änderungen bei reduzierter ZFP37-Expression, im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Analysen in primären Neuroblastomen.



**Abbildung 29:** ABCC4- und MGMT-Expression gemessen durch Real-Time PCR, normalisiert mit GAPDH. In den von LAN-1 Zellen abgeleiteten Einzellzellklonen mit ZFP37-Herunterregulation war die ABCC4-Expression im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen (pBD631-1 und -2) erniedrigt. Die MGMT-Expression blieb fast unverändert. Die inverse Korrelation ließ sich demnach nicht durch diese Analyse bestätigen.

#### 4.4.5 Analyse des Zusammenhangs zwischen ZFP37-Expressionsminderung durch RNS-Interferenz und Chemotherapie-Resistenz

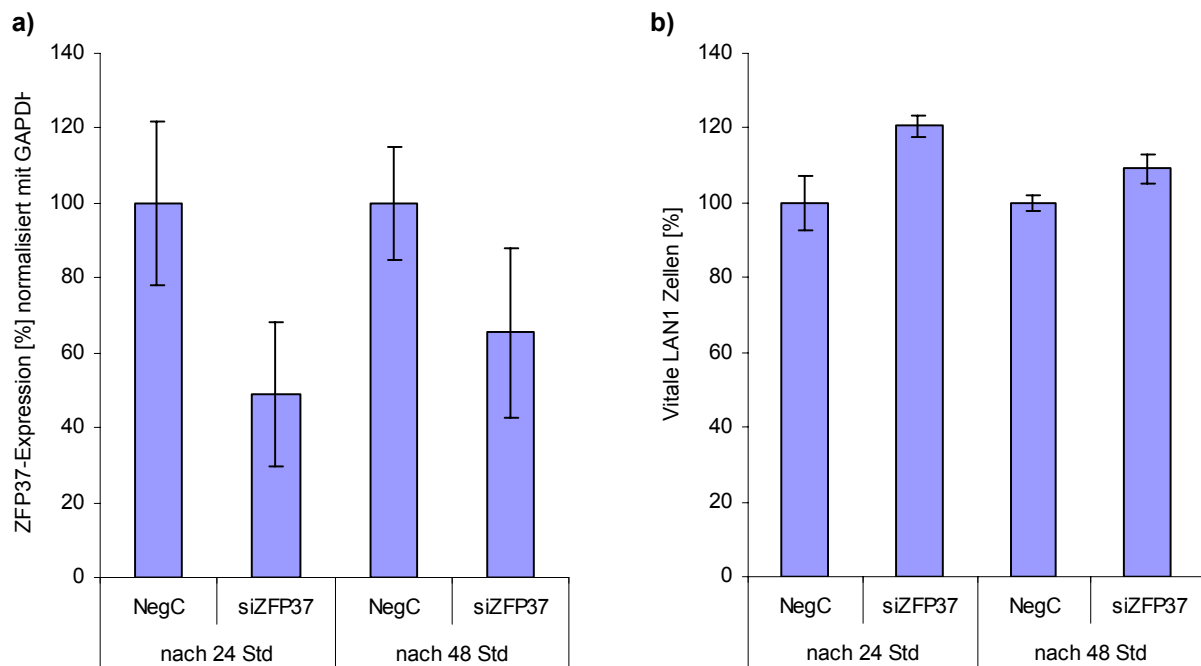
Die Herunterregulation der Genexpression durch RNS-Interferenz kann durch siRNS- oder shRNS-Transfektion erfolgen. Beide Verfahren wurden hier angewandt, um die ZFP37-Expression zu hemmen. Um den Zusammenhang zwischen Chemotherapie-Resistenz und verminderter ZFP37-Expression zu erforschen, wurden die Resistenzfaktoren der transfizierten Zellen gegen Zytostatika im MTT bestimmt und mit denen der Kontrollzellen verglichen.

##### 4.4.5.1 Herunterregulation der ZFP37-Expression durch siRNS-Transfektion

Die ZFP37-siRNS-Transfektion erfolgte wie in 3.2.21 beschrieben. 24 Stunden nach dieser transienten Transfektion war die ZFP37-Expression -bestimmt mittels semiquantitativer PCR- um 50% reduziert, 48 Stunden nach Transfektion war sie nur

noch 35% niedriger als in den mit transfektionsreagenzhaltigem Medium behandelten Kontrollzellen (NegC).

Der Einfluss der siRNS-Transfektion auf die Zellvitalität wurde mit Hilfe des MTT-Tests im Vergleich zu den NegC-Zellen bestimmt. 24 Stunden nach der Transfektion betrug die Zellvitalität 120%, 48 Stunden nach Transfektion 110% im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 30).



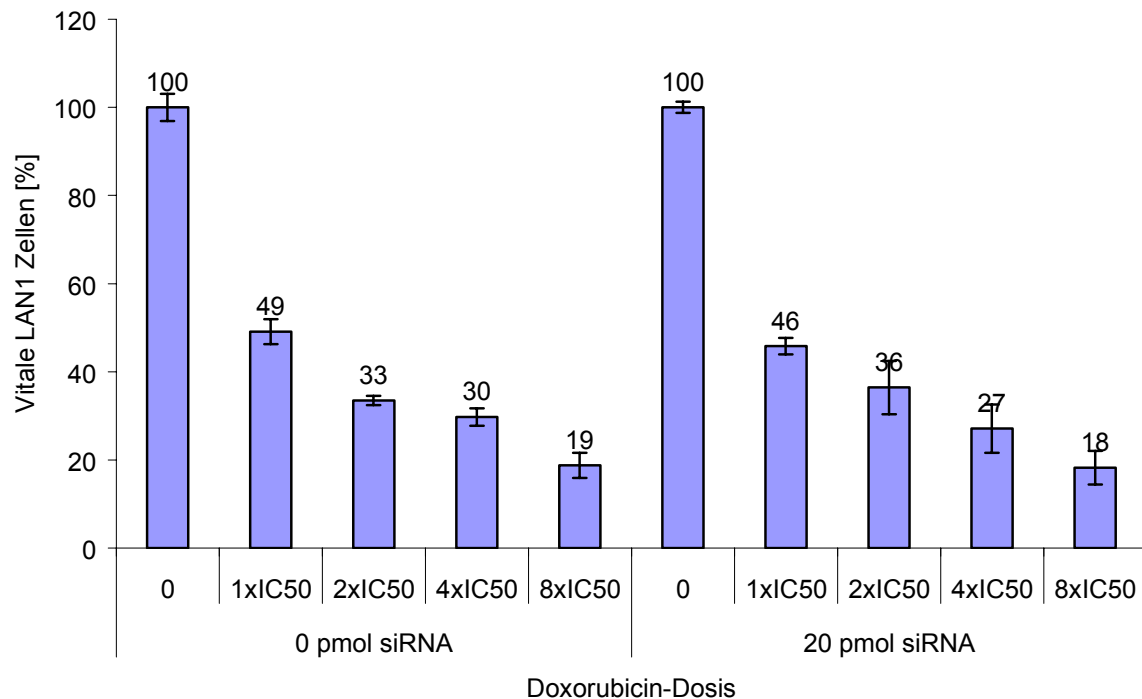
**Abbildung 30:** a) Die ZFP37-Expression in LAN1 Zellen war 24 Stunden nach siRNS-Transfektion um 50% im Vergleich zur Negativkontrolle (NegC) herunterreguliert, 48 Stunden nach Transfektion noch um 40% (gemessen durch semiquantitative PCR, densitometrische Auswertung). b) Die Zellvitalität betrug 24 Stunden nach siRNS-Transfektion 120% und 48 Stunden danach 110% im Vergleich zur Negativkontrolle, gemessen mit Hilfe des MTT-Tests ( $p = 0,016$ )

Die siRNS vermittelte Herunterregulation von ZFP37 hatte somit einen leicht positiven Einfluss auf die Zellvitalität ( $p=0,016$ ).

### Analyse der Resistenz gegen die Doxorubicin-Behandlung

Um zu analysieren, ob ein Zusammenhang zwischen herunterregulierter ZFP37-Expression und verstärkter Therapieresistenz bestand, wurden die Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit dem Zytostatikum Doxorubicin behandelt. Die Inkubation mit steigenden Dosen Doxorubicin erfolgte für 24 Stunden, bevor die Zellvitalität im MTT-Test im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Zytostatikuminkubation ausgewertet wurde. Die  $IC_{50}$  Dosis Doxorubicin betrug für die lediglich 24 Stunden dauernde Inkubation 1,98

µg/ml. Zwischen den Zellen mit siRNS-Transfektion vermittelter, erniedrigter ZFP37-Expression und den untransfizierten Kontrollzellen gab es unter Doxorubicininkubation keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl vitaler Zellen ( $p = 0,73$ ) (s. Abbildung 31). Eine transient reduzierte ZFP37-Expression wirkte sich nicht auf die Vitalität der Neuroblastomzellen nach Zytostatikumbehandlung aus.



**Abbildung 31:** Vergleich der Zytotoxizität steigender Dosen Doxorubicin ( $IC_{50}$  für 24 Stunden Inkubation = 1,98 µg/ml) auf Zellen, deren ZFP37-Expression durch siRNS-Transfektion herunterreguliert wurde versus untransfizierte Kontrollzellen. Im MTT-Test zeigten sich keine signifikanten ( $p = 0,73$ ) Unterschiede in der Zellvitalität unter Doxorubicin-Inkubation für die Zellen mit transient herunterregulierter ZFP37-Expression.

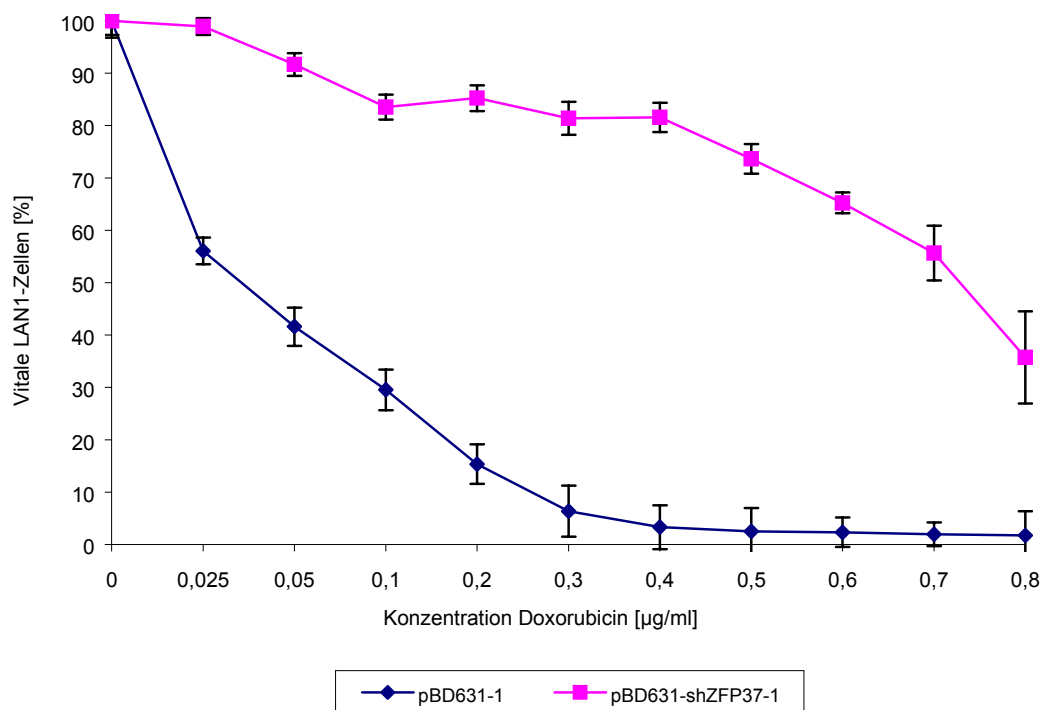
#### 4.4.5.2 Bestimmung der Zytotoxizität von Zytostatika in Zellen mit durch shRNS-Transfektion verminderter ZFP37-Expression

Um auszuschließen, dass sich durch die transiente Transfektion die ZFP37-Expression nicht lange genug herunterregulieren ließ, um den Einfluss der verminderten Expression auf die Sensitivität gegenüber einer Zytostatikumbehandlung zu ermitteln, wurden die Zellen stabil transfiziert und konnten über drei Tage mit einem Zytostatikum behandelt werden. Durch die Transfektion mit shRNS konnte die Genexpression von ZFP37

deutlich stärker herunterreguliert werden (vgl. 4.4.4) als durch die siRNS-Transfektion (s.o.). Die Zellen mit dauerhaft herunterregulierter ZFP37-Expression wurden unter Verwendung des MTT-Tests auf eine Resistenzentwicklung gegen Doxorubicin und andere Zytostatika untersucht.

### Analyse der Resistenz gegen die Doxorubicin-Behandlung

Exemplarisch wurden die pBD631-1 und pBD631-shZFP37-1 Zellen mit Doxorubicin inkubiert. Wie Abbildung 32 zeigt, betrug die  $IC_{50}$  für die Leervektorkontrolle nach drei Tagen Inkubation mit Doxorubicin 0,037  $\mu\text{g/ml}$ . Von den Zellen mit verminderter ZFP37-Expression starben erst bei einer Konzentration von 0,75  $\mu\text{g/ml}$  50% der Zellen. Somit waren die mit ZFP37-shRNS transfizierten Zellen um den Faktor 21 resistenter als die Kontroll- und WT-Zellen.



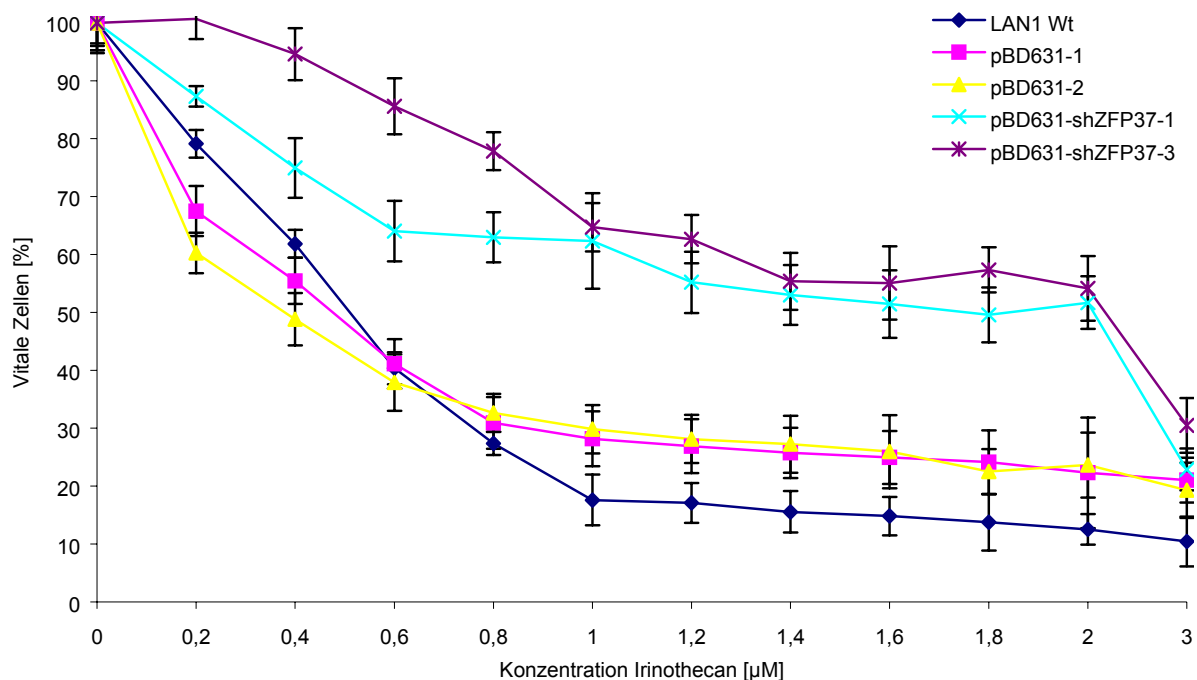
**Abbildung 32:** Die  $IC_{50}$  für Doxorubicin betrug in den Zellen mit durch shRNS-Transfektion unterdrückter ZFP37-Expression 0,75  $\mu\text{g/ml}$ , in den Kontrollzellen nur 0,037  $\mu\text{g/ml}$ . Die Zellen mit herunterregulierter ZFP37-Expression waren somit um den Faktor 21 resistenter, gemessen im MTT-Test nach drei Tagen Inkubation mit Doxorubicin.



### Analyse der Resistenz gegen die Irinotecan-Behandlung

Eine verstärkte ABCC4-Expression, wie sie in dieser Arbeit in primären Neuroblastomen in Korrelation mit einer verminderten ZFP37-Expression festgestellt wurde, ist *in vitro* maßgeblich an der Resistenzentwicklung gegen Irinotecan beteiligt (Norris, Smith et al. 2005). Daher wurde im Folgenden analysiert, ob die Zellen mit *in vitro* durch Transfektion herunterregulierter ZFP37-Expression eine verminderte Sensitivität gegen Irinotecan zeigten.

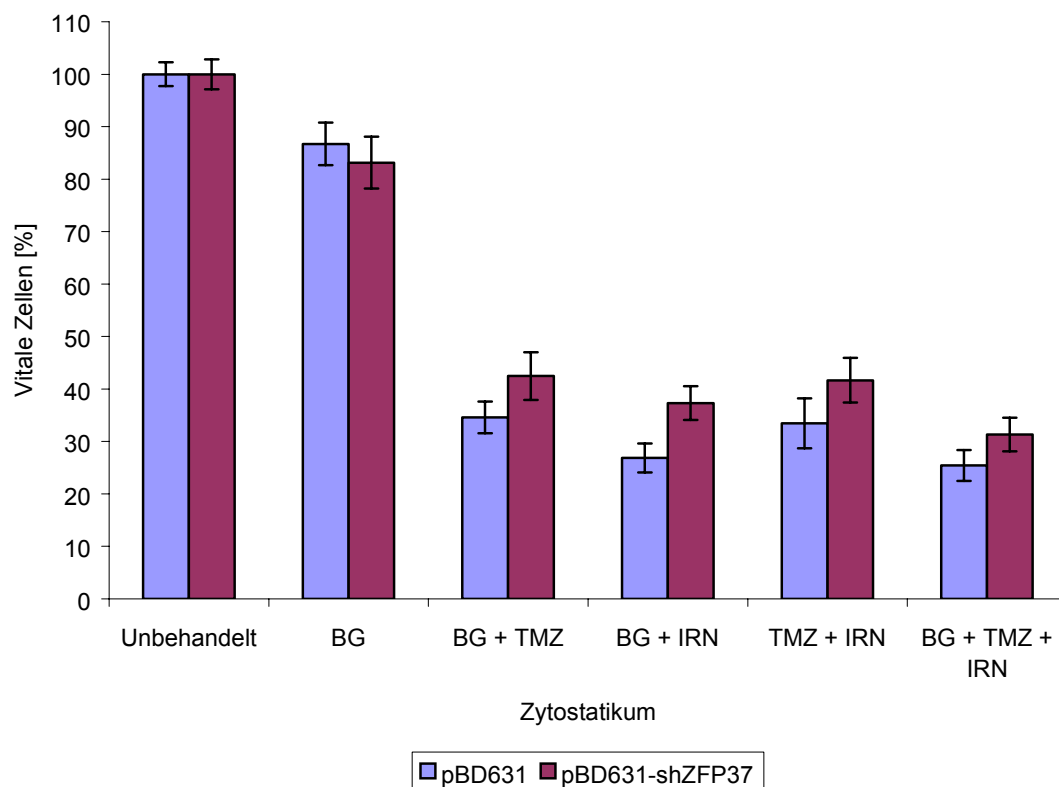
Beide Leervektorkontrollen, die LAN1 WT Zellen und die mit shRNS transfizierten Einzelklone 1 und 3 wurden dazu mit steigenden Dosen Irinotecan für vier Tage inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Zellen mit verminderter ZFP37-Expression resistenter gegen die Behandlung waren als die Zellen mit höherer ZFP37-Expression (s. Abbildung 33). Die  $IC_{50}$  für die WT Zellen lag bei etwa 0,5  $\mu$ M, für die Vektorkontrolle pBD631-1 bei 0,45  $\mu$ M, für die Vektorkontrolle pBD631-2 bei 0,4  $\mu$ M, für die pBD631-shZFP37-1 Zellen bei 1,8  $\mu$ M und die pBD631-shZFP37-3 Zellen bei 2,2  $\mu$ M. Damit waren die Zellen mit verminderter ZFP37-Expression etwa um den Faktor 5 resistenter gegen Irinotecan als die Kontrollzellen.



**Abbildung 33:** Bestimmung der  $IC_{50}$  von Irinotecan in LAN1 WT Zellen, mit ZFP37-shRNS transfizierten Zellen und Vektorkontrollzellen mittels MTT. Die Zellen mit verminderter ZFP37-Expression waren etwa um den Faktor 5 resistenter gegen Irinotecan als die Kontrollzellen.

## Analyse der Resistenz gegen eine Kombinationsbehandlung aus O6-Benzylguanin, Temozolomid und Irinotecan

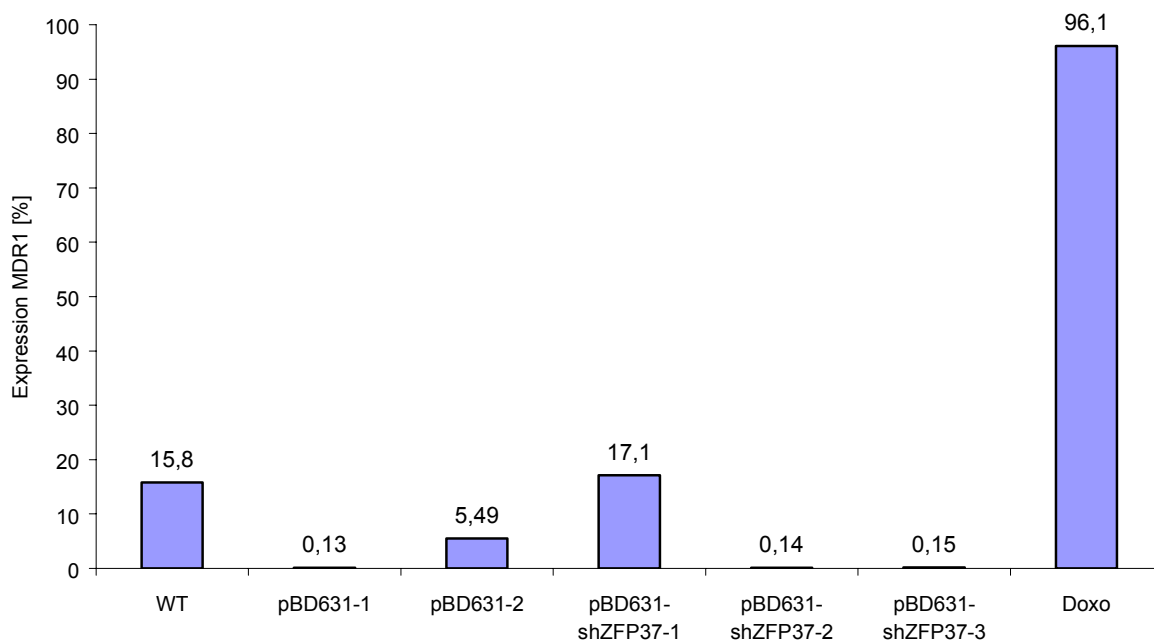
Zellen mit durch shRNS-Transfektion erniedrigter ZFP37-Expression und kontrolltransfizierte Zellen wurden nach dem Protokoll von (Wagner, McLendon et al. 2007) für 24 Stunden mit O6-Benzylguanin inkubiert, bevor Temozolomid und 60 Minuten später auch Irinotecan (IRN) zugegeben wurden. Diese Kombination zeigt sich in klinischen Studien mit therapieresistenten Neuroblastomen erfolgversprechend. 72 Stunden nach der Inkubation mit dieser Kombinationstherapie zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Zellen mit niedriger und normaler ZFP37-Expression im Zytotoxizitätstest (vgl. Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Der MTT-Zytotoxizitätstest ergab keine signifikanten Unterschiede in der Sensitivität gegen die Kombinationstherapie aus BG, TMZ und IRN zwischen kontrolltransfizierten Zellen und Zellen mit herunterregulierter ZFP37-Expression (BG = O6-Benzylguanin, TMZ = Temozolomid, IRN = Irinotecan).

#### 4.4.6 Analyse der Beteiligung von MDR1 an der Resistenzentwicklung in Zellen mit herunterregulierter ZFP37-Expression

Durch eine Durchflusszytometer-Analyse (vgl. 3.2.23) wurde die MDR1-Expression der Zellen, deren ZFP37-Expression durch shRNS-Transfektion herunterreguliert wurde, mit der in Kontrollzellen verglichen. Damit sollte überprüft werden, ob die verminderte ZFP37-Expression an der Entwicklung der Resistenz gegen Doxorubicin beteiligt war oder ob gleichzeitig die Expression anderer resistenzbeteiligter Gene anstieg. Wie in Abbildung 35 dargestellt, exprimierten 16 % der LAN1 Wildtypzellen und 17 % der pBD631-shZFP37-1 Zellen MDR1 und 5 % der Vektorkontrollzellen pBD631-2. Die anderen Vektorkontrollzellen und Einzelklone exprimierten kein MDR. Erwartungsgemäß exprimierten jedoch 96 % der gegen Doxorubicin resistent gezüchteten Zellen MDR1. Somit konnte ein Anstieg der Expression und damit eine Beteiligung von MDR1 an der Resistenzentwicklung der Zellen mit verminderter ZFP37-Expression ausgeschlossen werden.



**Abbildung 35:** Die Expression des MDR1-Gens lag in den Zellen mit herunterregulierter ZFP37-Expression etwa auf dem Niveau der Wildtypzellen. 96% der Doxorubicin-resistenten Zellen (Doxo) exprimierten dagegen MDR1. Damit ist die MDR1-Expression in Doxo<sup>R</sup> Zellen 6fach höher als im WT.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden in einer genomweiten Microarray-Analyse in chemotherapieresistenten und –sensitiven Neuroblastomen Gene identifiziert, die durch aberrante Methylierung und Expression für die Entstehung von Therapieresistenzen von Bedeutung sein könnten. Dabei wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der epigenetischen Herunterregulation des Zinkfingerproteins ZFP37 und der Resistenz gegen in der Neuroblastom-Therapie häufig eingesetzte Zytostatika aufgedeckt. Die ZFP37-Expression ließ sich durch DNS-Demethylierung wiederherstellen. Im präklinischen Modell zeigten resistente versus sensitive Zellen eine verminderte ZFP37-Expression. In primären Neuroblastomen war die verminderte ZFP37-Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert. Als zweites resistenzassoziiertes und epigenetisch reguliertes Gen wurde IGSF4 analysiert: Im Gegensatz zu anderen Tumoren war die verminderte Expression dieses potentiellen Tumorsuppressorgens im Neuroblastom nicht in einer Hypermethylierung der Promotorregion begründet.

### 5.1 Präklinische Charakterisierung der Chemotherapie-Resistenz beim Neuroblastom

Für diese Arbeit wurden die von Frau Dr. K. Ehleben für ihre Doktorarbeit resistent gezüchteten Zelllinien verwendet. Es handelte sich um LAN1 und Kelly Zellen, die im Vergleich zu den therapiesensitiven WT-Zellen um ein Vielfaches resistenter gegen die häufig in der Neuroblastomtherapie eingesetzten Zytostatika Doxorubicin, Etoposid oder Cisplatin waren (Tabelle 7, Seite 92).

**Tabelle 7: Resistenzfaktoren der gegen Doxorubicin, Etoposid oder Cisplatin resistent gezüchteten LAN1 und Kelly Zellen im Vergleich zum Wildtyp**

	Doxorubicin	Etoposid	Cisplatin
LAN1	30	5	4
Kelly	20	4	3

Es sind derzeit verschiedene Resistenzmechanismen gegen Doxorubicin und Etoposid bekannt. Ein möglicher Mechanismus, der zur Resistenz gegen diese Therapeutika führt, ist die erhöhte Aktivität der Membranpumpe P-Glykoprotein 170 (kodiert durch das Gen MDR1) und daraus resultierend eine abnehmende Zytostatikumkonzentration

innerhalb der Zelle. Die Resistenz gegen Etoposid kann zudem durch eine veränderte Topoisomerase-II Aktivität entstehen. An der Entstehung der Cisplatinresistenz sollen z.B. eine vermehrte DNS-Reparatur durch eine epigenetisch regulierte Überexpression der Endonuklease ERCC1 (Chen, Shao et al. 2009) und die Inaktivierung von Cisplatin durch Bindung an die SH-Gruppen von Metalloproteinen oder Glutathion beteiligt sein.

In dieser Arbeit wurde in den verwendeten Zellen eine Kreuzresistenz zwischen Doxorubicin und Etoposid festgestellt: Doxo<sup>R</sup> Zellen waren 5fach resistenter gegen Etoposid als Doxorubicin-sensitive WT Zellen; Etop<sup>R</sup> Zellen waren 30fach resistenter gegen Doxorubicin als Etoposid-sensitive Zellen. Dies ist vermutlich durch eine verstärkte Expression des MDR1 Gens in den beiden resistenten Sublinien bedingt. Die Durchflusszytometer-Analyse zeigte eine 6fach höhere Expression von MDR1 in den Doxo<sup>R</sup> Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Da sich die Resistenzmechanismen zwischen Doxorubicin- und Etoposid-resistenten Zellen ähneln, konnten viele Analysen exemplarisch an Doxo<sup>R</sup> Zellen durchgeführt werden. Zu Cisplatin zeigten Doxo<sup>R</sup> oder Etop<sup>R</sup> Zellen keine Kreuzresistenz, was vermutlich in den unterschiedlichen Resistenzmechanismen begründet liegt.

Trotz dieser bekannten Mechanismen sind noch nicht alle Details zur Entwicklung von Resistenzen geklärt. Eine große Rolle spielt die epigenetische Regulation der Genexpression, die dazu beiträgt, dass zuvor therapiesensitive Tumorzellen gegen Zytostatika resistent werden (Costello and Plass 2001).

## **5.2 DMH zur Analyse von chemoresistenz-assoziierten Genen**

Die DMH-Analyse ist eine zeit- und kosteneffektive Methode, um genomweit nach de novo methylierten oder demethylierten DNS-Sequenzen zu suchen. In einem Ansatz kann der Methylierungsgrad zweier Proben durch ihre Kohybridisierung auf einem Chip direkt miteinander verglichen werden. Hierdurch und durch die parallele Aufbereitung der Proben (vgl. 3.2.20) sinkt das Risiko, falsch positive oder negative Kandidatengene zu erhalten. Für die notwendige Validierung des Ergebnisses der DMH-Analyse sind verschiedene Methoden etabliert, um definierte DNS Abschnitte auf ihr Methylierungsmuster zu analysieren.

In dieser Arbeit wurde mit der DMH-Analyse erstmals das Gen ZFP37 (s. 5.3) in resistenten Neuroblastomzellen als abweichend methyliert identifiziert. Der Vergleich

der DNS aus Doxorubicin-, Etoposid- oder Cisplatin-resistenten LAN1 und Kelly Zellen mit der aus sensitiven WT Zellen zeigte, dass ZFP37 in LAN1 Doxo<sup>R</sup>, LAN1 Etop<sup>R</sup> und Kelly CP<sup>R</sup> Zellen hypermethyliert war. Bei dieser Analyse wurde in LAN1 CP<sup>R</sup> Zellen keine signifikant hypermethylierte Sequenz im Vergleich zum Wildtyp gefunden, wohl aber mehrere hypomethylierte (s. Anhang 2, S. 112 ff). Scheinbar ist diese resistente Sublinie generell von einer DNS-Hypomethylierung betroffen. Dies könnte die Hypomethylierung von ZFP37 in LAN1 CP<sup>R</sup> Zellen erklären. Genomweite Hypomethylierungen wurden bereits in verschiedenen Tumorentitäten beobachtet (Costello and Plass 2001), wobei sie mit chromosomalen Instabilitäten, aber auch mit einer verstärkten Tumorprogression in Verbindung gebracht wurden. Inwieweit die Langzeitinkubation mit Cisplatin die Hypomethylierung bewirkt oder ob die Hypomethylierung dazu beiträgt, dass Zellen gegen Cisplatin resistent werden können, bleibt zu überprüfen.

ZFP37 besitzt zwei CpG-Inseln, die der Definition von (Gardiner-Garden and Frommer 1987) entsprechen, sowie drei kürzere CpG-Inseln. Die durch DMH-Analyse untersuchte Sequenz liegt in der zweiten großen CpG-Insel und überlappt mit der ersten codierenden Sequenz.

Die beschriebene DMH-Methode erhebt allerdings keinen Anspruch auf Vollständigkeit zur Identifizierung aberrant methylierter Fragmente. CpG-Inseln, die nicht von einer MseI Erkennungssequenz flankiert sind, werden durch diese Analysemethode nicht erfasst. Zu ihnen gehören z.B. die Promotorregionen der Tumorsuppressorgene p16INK4a, p15INK4b und TIMP3 (Yan, Chen et al. 2002). Bei chip-basierten Verfahren besteht generell eine Limitierung der analysierbaren Sequenzen auf solche Fragmente, die vorher selektiert und als Sonde auf den Chip aufgebracht wurden. Umfassendere Ergebnisse erhielte man durch die genomweite Sequenzierung bisulfit-modifizierter DNS oder durch die Methyl-DNS-Immunopräzipitation (MeDIP) gefolgt von einer Hochdurchsatz-Sequenzierung. Bei der Verwendung dieses DMH-Chips waren nicht alle auf den Chip gespotteten Sequenzen bekannt, so dass viele der als abweichend methyliert identifizierten DNS-Abschnitte zunächst sequenziert und nach Abgleich mit dem Genom bestimmten Genen oder auch repetitiven Sequenzen zugeordnet werden mussten.

### **5.3 Verminderte ZFP37-Expression in resistenten Tumorzellen**

Das Zinkfingerprotein ZFP37, für das im Rahmen dieser Arbeit eine abweichende Expression in resistenten versus sensitiven Zellen festgestellt wurde, ist bisher im Zusammenhang mit Neuroblastomen noch nicht beschrieben. Dieser putative Transkriptionsfaktor ist auf Chromosom 9q32 lokalisiert. Das Protein besteht aus 12 Zinkfinger Motiven und einer KRAB Domäne (Krüppel assoziierte Box), die als transkriptioneller Repressor fungieren kann (Dreyer, Zhou et al. 1998). Zudem trägt ZFP37 in Mauszellen eine Histon H1-ähnliche Linker Domäne, mit der es an doppelsträngige DNS binden kann. Wie in (Payen, Verkerk et al. 1998) beschrieben, scheint ZFP37 für die Änderung oder den Erhalt der Chromatinstrukturen in Neuronen und dadurch für die Regulation der rRNS Synthese oder der Genexpression von Bedeutung zu sein. Dabei wurde in Mauszellen gezeigt, dass ZFP37 in allen Neuronen des zentralen Nervensystems und im Gehirn ausschließlich in Neuronen exprimiert wird, wobei die Expression physiologisch auf postmitotische Zellen beschränkt ist (Mazarakis, Michalovich et al. 1996). Außerdem ist es an der Regulation der Spermatogenese beteiligt (Rockett, Patrizio et al. 2004). In Ratten dagegen wird ZFP37 u.a. in der Leber exprimiert. Die ZFP37-Expression kann durch Mitglieder der PPAR (Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor)-Familie, so z.B. durch PPAR $\alpha$ , induziert werden (Vanden Heuvel, Holden et al. 1998).

Über die Funktion von ZFP37 beim Menschen ist derzeit wenig bekannt. (Paz, Wei et al. 2003) zeigten, dass ZFP37 in Kolonkarzinom-Zelllinien und in der Mehrzahl der von ihnen analysierten humanen Kolonkarzinome methyliert vorliegt, während es in normalem Kolongewebe nicht methyliert ist. Die Tatsache, dass dieser potentielle transkriptionelle Repressor in diesen Krebszellen epigenetisch herunterreguliert ist im Vergleich zu gesundem Gewebe, lässt ZFP37 auch im Neuroblastom zu einem interessanten Kandidatengen für Analysen seiner Expression, epigenetischen Regulation und Funktion werden.

Im hier verwendeten präklinischen Modell aus gegen Doxorubicin und Cisplatin resistent gezüchteten Zellen exprimierten diese deutlich weniger ZFP37-mRNS als die WT Zellen. In den LAN1 Doxo<sup>R</sup> und CP<sup>R</sup> Zellen war die Expression 6fach und in den jeweiligen resistenten Kelly Zellen 9fach niedriger als in den therapiesensitiven Zellen. Diese transkriptionelle Repression korreliert mit der durch DMH-Analyse ermittelten

Hypermethylierung der DNS in Doxo<sup>R</sup> und CP<sup>R</sup> Kelly Zellen und Doxo<sup>R</sup> LAN1 Zellen. Eine Ausnahme bildeten die LAN1 CP<sup>R</sup> Zellen, deren DNS im Vergleich zum Wildtyp genomweite Hypomethylierungen aufwies. In dieser Sublinie konnte keine hypermethylierte Sequenz gefunden werden, so auch nicht für die ZFP37 Region. Daher kann man vermuten, dass andere Regulationsmechanismen die ZFP37-Expression in LAN1 CP<sup>R</sup> stärker beeinflussten als die Hypomethylierung dieses Genabschnitts. So kann man vermuten, dass die ZFP37-Expression in LAN1 CP<sup>R</sup> nicht allein durch die Hypomethylierung des bei der DMH-Analyse untersuchten Genabschnitts reguliert wird, sondern dass ein oder mehrere, durch diese Analysemethode nicht erfasste andere DNS-Abschnitte des ZFP37-Gens hypermethyliert sind - zumal die Promotorregion dieses Gens noch nicht definiert wurde.

Auch die Proteinexpression, exemplarisch in LAN1 Doxo<sup>R</sup> versus WT Zellen gemessen, war in den resistenten Zellen um ein Drittel vermindert. Die durchgeführten Expressionsanalysen sprechen dafür, dass in den untersuchten Zelllinien die Resistenz gegen Doxorubicin oder Cisplatin mit einer verminderten ZFP37-Expression assoziiert ist.

Der Zusammenhang zwischen einer niedrigen ZFP37-Expression und therapieresistenten Tumorzellen *in vitro* ließ sich in primären Neuroblastomen validieren. Der Vergleich der ZFP37-Expression in 69 Tumoren verschiedener Stadien zeigte, dass signifikant ( $p < 0,003$ ) weniger ZFP37 in Tumorproben von Patienten mit metastasierten, therapieresistenten Neuroblastomen und schlechter Prognose exprimiert wurde. Neuroblastome mit guter Prognose wiesen dagegen die doppelte Expressionshöhe auf. Der Zusammenhang zwischen einer niedrigen ZFP37-Expression und der Therapieresistenz in Neuroblastomzellen, sowie die Frage, ob die verminderte Expression in einer Hypermethylierung der DNS begründet liegt, wurden in dieser Arbeit im Folgenden untersucht: Wurden sensitive LAN1 Zellen drei Tage lang mit Doxorubicin inkubiert, stieg dosisabhängig die ZFP37-Proteinexpression an. Bei Inkubation mit der 4fachen IC<sub>50</sub> betrug sie das 5fache im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Dabei erhöhte sich vor allem die Konzentration von ZFP37 im Nukleus. Im Gegensatz dazu sank in Doxorubicin-resistenten Zellen die ZFP37-Expression, wenn sie mit steigenden Dosen Doxorubicin inkubiert wurden. Nach Behandlung mit der 4fachen IC<sub>50</sub> betrug sie im Zellkern nur noch 50%. Diese Analysen zeigten, dass ZFP37 in resistenten und sensitiven Zellen nicht nur unterschiedlich exprimiert wird, sondern auch, dass die



Zellen in Bezug auf die ZFP37-Expression unterschiedlich auf Doxorubicin reagierten. Die resistenten Zellen drosselten die ZFP37-Expression im Zellkern dosisabhängig noch weiter, während die chemosensitiven Zellen die Expression als Reaktion auf die Inkubation mit Doxorubicin erhöhten. Dies lässt auf einen Mechanismus zur Hemmung der Genexpression in resistenten Zellen schließen. Möglicherweise ist die Verminderung der Expression epigenetisch reguliert.

Durch die Verwendung eines Zellkulturmodells mit shRNS-vermittelter Herunterregulation der ZFP37-Expression konnte gezeigt werden, dass die gezielte Verminderung dieser Genexpression die Sensitivität von LAN1 Zellen gegen Doxorubicin verminderte. Die transfizierten Zellen waren um den Faktor 21 resistenter gegen Doxorubicin als die Kontrollzellen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Verminderung der ZFP37-Expression an der Entwicklung einer Therapieresistenz beteiligt ist.

#### **5.4 Verminderung der ZFP37-Expression durch DNS-Methylierung**

Die einzelnen CpGs, der durch DMH-Analyse als abweichend methyliert identifizierten Region, wurden durch die Bisulfit-Sequenzierungsanalyse untersucht. Die Bisulfit-Sequenzierung, mit der mehrere einzelne CpGs gleichzeitig auf ihr Methylierungsmuster untersucht werden können, zeigte feine Differenzen zwischen resistenten und sensitiven Zellen in den großen CpG-Inseln des ZFP37-Gens auf. Zwar war die DNS in beiden Sublinien methyliert, in den Doxorubicin-resistenten Zellen waren jedoch 8 von 35 untersuchten CpGs um 20% stärker methyliert als in den therapiesensitiven Zellen, 3 waren hypomethyliert. Dieser Unterschied im Methylierungsmuster allein kann nicht erklären, warum die ZFP37-Expression in den resistenten Zellen derart vermindert war. Die durch DMH-Analyse gemessene Hypermethylierung dieser Sequenz in Doxo<sup>R</sup> versus WT Zellen konnte nicht zweifelsfrei bestätigt werden.

Allerdings kann ZFP37 durch die Demethylierung der DNS mit 5-Aza-dC reexprimiert werden. Das weist darauf hin, dass die Hypermethylierung einer nicht durch Bisulfit-Sequenzierung oder COBRA (s.u.) untersuchten Genregion für die Verminderung der Expression von ZFP37 verantwortlich ist. Alternativ bewirkt 5-Aza-dC die Demethylierung und damit Expression eines noch zu bestimmenden Regulators der ZFP37-Expression. In Doxorubicin- und Cisplatin-resistenten Zellen erhöhte sich die

Expression von ZFP37 durch DNS-Demethylierung mit 5-Aza-dC um das Vierfache, während sie im WT nur leicht anstieg, in Doxorubicin-resistenten Kelly Zellen um das Doppelte, in Cisplatin-resistenten und WT Zellen leicht. Auch durch die COBRA Analyse, mit der drei verschiedene CpG-Inseln exemplarisch untersucht wurden, konnte der hypermethylierte DNS-Abschnitt nicht gefunden werden. Die Analyse zeigte Methylierungen in CGI-1 und CGI-3, Unterschiede im Grad der Methylierung zwischen resistenten und sensitiven Zellen waren jedoch nicht detektierbar. Mit dieser Methode werden allerdings nur wenige definierte CpGs eines DNS-Abschnitts untersucht, die von den Restriktionsenzymen erkannt werden können. Daher ist nicht auszuschließen, dass die CpG-Inseln an anderer Stelle abweichend methyliert sind.

Durch die genomweite DMH-Analyse wurde nur die oben beschriebene Sequenz als aberrant methyliert detektiert. Dies könnte auch daran liegen, dass die restliche DNS des ZFP37-Gens nicht als Sonde auf dem Microarray vertreten war und daher keine anderen Sequenzen dieses Gens auf dem Chip binden konnten. Um die in resistenten Zellen hypermethylierte DNS-Sequenz zu finden, die die Expression von ZFP37 inhibiert, wären weitere Analysen der gesamten Basenfolge notwendig, wobei CpG-Inseln nahezu immer die Promotorregion und/oder Exone umspannen (Costello and Plass 2001).

Zusammenfassend ist die epigenetische Herunterregulation von ZFP37 beim Neuroblastom mit fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert und trägt vermutlich indirekt zur Chemotherapie-Resistenzentwicklung bei.

## **5.5 Zusammenhang zwischen ZFP37 und anderen Resistenzgenen**

Um zu prüfen, ob im Neuroblastom tatsächlich die Herunterregulation von ZFP37 bei der Entwicklung der Therapieresistenz gegen Doxorubicin von Bedeutung ist, bzw. welche Gene ZFP37-abhängig die Resistenz gegen Zytostatika beeinflussen, wurde zunächst die Expression von MDR1 in Abhängigkeit zur Expressionshöhe von ZFP37 gemessen. MDR1 oder ABCB1 ist ein membranassoziiertes Transportprotein, das zur Familie der ATP-binding cassette (ABC) Transporter gehört. Durch seine geringe Substratspezifität, mit der es Xenobiotika aus der Zelle befördert, ist es für eine verminderte Akkumulation von Zytostatika in multiresistenten Zellen verantwortlich und auch an der Resistenz gegen Doxorubicin beteiligt (Xia, Zhu et al. 2008). Die

Durchflusszytometer-Analyse ergab, dass die MDR1 Expression in ZFP37-shRNS transfizierten Zellen nicht höher war als in den LAN1 WT Zellen. Die Steigerung der Resistenz in Zellen mit gehemmter ZFP37-Expression wurde demnach nicht durch eine Zunahme der MDR1 Expression ausgelöst.

Dagegen wurde bei der Reanalyse genomweiter Expressionsdaten aus 69 primären Neuroblastomen eine inverse Korrelation zwischen der ZFP37-Expression und der Expression der chemoresistenzmodulierenden Gene ABCC4 und MGMT nachgewiesen. ABCC4 („ATP-binding cassette, subfamily C, member 4“) oder MRP4 gehört zur Familie der „multidrug resistance-associated protein“ Transportproteine und ist in primären Neuroblastomen mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert. *In vitro* ist es maßgeblich an der Resistenzentwicklung gegen Irinotecan beteiligt (Norris, Smith et al. 2005). Der Zytotoxizitätstest *in vitro* mit Zellen mit durch shRNS-Transfektion verminderter ZFP37-Expression zeigte, dass diese Zellen wie erwartet um den Faktor 5 resistenter gegen Irinotecan waren als die Kontrollzellen. Im Zellkulturmodell ließ sich die inverse Korrelation zwischen der ZFP37- und ABCC4-Expression jedoch nicht bestätigen. Die beobachtete Zunahme der Resistenz gegen Irinotecan in Zellen mit herunterregulierter ZFP37-Expression *in vitro* liegt somit vermutlich nicht an einer ZFP37-abhängigen Expressionszunahme des Transportproteins ABCC4, das den Efflux von Irinotecan aus der Zelle bewirkt, sondern an bisher nicht identifizierten Mechanismen. Eine Möglichkeit zur Anreicherung und Ermittlung von Effektoren wäre die Chip Analyse, bei der man in Zellen mit normaler und herunterregulierter ZFP37-Expression nach Veränderungen der Expression assoziierter Gene forscht.

Ob und in welchem Ausmaß die gemessene gesteigerte ABCC4-Expression in primären Tumoren mit schlechter Prognose bei der Resistenzentwicklung von Bedeutung ist, kann aus diesem Experiment nicht abgeleitet werden. Der Nachweis könnte durch die Modulation der ABCC4-Expression und die Messung einer Sensitivitätsänderung gegen Irinotecan -wie von (Norris, Smith et al. 2005) vorgeschlagen- erfolgen. Eine anderer Weg zur Überprüfung der Beteiligung von ABCC4 an der Irinotecan-Resistenz wäre, die Expression von ABCC4 in sensiblen Zellen mit der in *in vitro* gegen Irinotecan resistent gezüchteten Zellen zu vergleichen. Ein Zusammenhang zwischen ABCC4 und dem Transport von Doxorubicin aus Zellen wurde bislang nicht belegt.

Eine erhöhte Expression der DNS-Reparatur Proteinmethylguanin-DNS-Methyltransferase MGMT ist an der Resistenz gegen alkylierende Zytostatika wie

Temozolomid beteiligt. Dabei scheint die Kombinationstherapie aus dem MGMT-Inhibitor O6-Benzylguanin mit Temozolomid und Irinotecan bei rezidivierenden, resistenten Neuroblastomen eine vielversprechende Option zu sein (Wagner, McLendon et al. 2007). Daher wurde untersucht, ob Zellen mit *in vitro* gehemmter ZFP37-Expression und Kontrollzellen unterschiedlich auf die Behandlung mit BG, TMZ und IRN reagierten. Die Zellen mit *in vitro* verminderter ZFP37-Expression zeigten keine gesteigerte Resistenz.

Im Zellkulturmodell lag keine inverse Korrelation zwischen der ZFP37- und der MGMT-Expression vor. Die Hemmung der Expression des transkriptionalen Repressors ZFP37 führte nicht zu einer gesteigerten Expression von ABCC4 oder MGMT. Damit lässt sich ausschließen, dass ZFP37 alleiniger Regulator der ABCC4 oder MGMT-Expression ist. Es könnte jedoch ein übergeordneter Regulationsmechanismus für die Expression der drei Gene vorliegen. Dieser ist noch nicht aufgedeckt.

Die gezielte Herunterregulation von ZFP37 resultierte in einer erhöhten Chemotherapie-Resistenz der shRNS-transfizierten Zellen gegen Doxorubicin und Irinotecan im Vergleich zu untransfizierten LAN1 Zellen und kontroll-transfizierten Zellen. Die Herunterregulation der ZFP37-Expression durch siRNS-Transfektion war dabei keine geeignete Methode. Der reprimierende Effekt bei dieser transienten Transfektion hielt nicht lange genug an, um den Effekt der Zytostatikum-Inkubation auf die Zellvitalität auswerten zu können. Der genaue Mechanismus, mit dem die Verminderung der ZFP37-Expression die Resistenz erhöht, bleibt unklar.

Im hier verwendeten *in vitro* Modell lies sich die inverse Korrelation von ZFP37 und ABCC4 oder MGMT nicht ursächlich mit der Resistenz gegen Doxorubicin oder Irinotecan korrelieren. Die Resistenz gegen diese Zytostatika wird jedoch durch ZFP37 beeinflusst. Die Kombinationstherapie aus O6-Benzylguanin, Temozolomid und Irinotecan ist dagegen auch in Zellen mit *in vitro* gehemmter ZFP37-Expression wirksam.

## **5.6 Bedeutung von IGSF4 für die Resistenzentwicklung**

Mit IGSF4 wurde in dieser Arbeit ein weiteres Gen auf seine epigenetische Regulation in resistenten versus sensitiven Neuroblastomen untersucht. IGSF4 (Immunglobulin

Superfamily, Member 4) ist auch unter dem Namen TSLC1 (Tumor Suppressor in Lung Cancer 1) oder CADM1 (Cell Adhesion Molecule 1) bekannt.

Es steht seit langem im Verdacht, durch seine verminderte Expression an der Progression und einer schlechten Prognose von Lungenkrebs und anderen Tumoren beteiligt zu sein (Ito, Shimada et al. 2003). (Kuramochi, Fukuhara et al. 2001) zeigten die Funktion von IGSF4 als Tumorsuppressorgen, das in NSCLC Zelllinien oder primären Lungenkarzinomen, sowie in hepatozellulären und pankreatischen Karzinomen vermindert exprimiert wird. Diese verminderte Expression beruht auf einer biallelischen oder monoallelischen Hypermethylierung des Gens oder auf einer 11q Deletion, bzw. einer Kombination beider Aberrationen. Inzwischen wurde eine verminderte Expression des Tumorsuppressors in verschiedenen weiteren Krebsarten festgestellt.

IGSF4 stellt auch in Neuroblastomen ein potentiell Tumorsuppressorgen dar (De Preter, Vandesompele et al. 2006). Es ist in Tumorzellen im Vergleich zu foetalen Neuroblasten herunterreguliert. Dies bestätigte sich in einer Genexpressionsanalyse mit 251 primären Tumoren (Nowacki, Skowron et al. 2008). In primären Neuroblastomen ist eine verminderte IGSF4-Expression zudem mit einer schlechten Prognose assoziiert. Dagegen hemmt die IGSF4 Überexpression die Zellproliferation *in vitro* in Neuroblastomzellen (Ando, Ohira et al. 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Reexpression des Gens nach Behandlung von Neuroblastom Zelllinien mit demethylierenden Agenzien stattfindet (Michels, Hoebeeck et al. 2008), was darauf schließen lässt, dass IGSF4 hypermethyliert vorliegt. Um zu überprüfen, ob dies der Hauptmechanismus zur IGSF4 Regulation in Neuroblastomen ist, wurde in dieser Arbeit das Methylierungsmuster der Promotorregion in 18 primären Tumoren mit unterschiedlicher IGSF4-Expression mit Hilfe der Bisulfitsequenzierungsmethode analysiert und verglichen. Unabhängig vom Expressionsgrad war das Methylierungsmuster in allen untersuchten Proben gleich, nur das erste von jeweils 8 analysierten CpGs war methyliert. Dieses Ergebnis spricht gegen eine DNS Hypermethylierung als Ursache der verminderten Expression in Neuroblastomen, im Gegensatz zur epigenetischen Regulation in anderen Krebsarten (Steenbergen, Kramer et al. 2004). Die Analysen von (Ando, Ohira et al. 2008) und (Michels, Hoebeeck et al. 2008) mit primären Neuroblastomen und Neuroblastomzelllinien bestätigten das hier gefundene Ergebnis.

IGSF4 liegt auf Chromosom 11q23.2 in einer vermuteten Neuroblastom-Tumorsuppressorgen-Region. Die Deletion dieser Region, ist in Neuroblastomen ein wichtiger Marker für eine ungünstige Prognose (Spitz, Hero et al. 2006). Die Verringerung der IGSF4-Genexpression durch 11q Deletion oder Haploinsuffizienz konnte jedoch in der Arbeit von (Nowacki, Skowron et al. 2008) ausgeschlossen werden. Ebenso war keine Mutation Ursache der IGSF4 Inaktivierung. Die Beteiligung anderer möglicher Faktoren, wie eine Herunterregulation möglicher Aktivatoren oder die Überexpression von Repressoren, sowie die epigenetische Regulation durch Histon-Deacetylierung, die die IGSF4-Expression erschweren, bleiben zu analysieren.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Aberrante DNS-Methylierungen sind mit der Krebsentstehung und Entwicklung von Chemotherapie-Resistenzen, einer großen Hürde bei der Behandlung rezidivierender Neuroblastome (NB), assoziiert. In dieser Arbeit wurde in chemotherapieresistenten und –sensitiven Neuroblastomen nach Genen gesucht, die durch Unterschiede in ihrer epigenetischen Regulation und Expression an der Entwicklung einer Therapieresistenz beteiligt sein können. Dazu wurde in chemotherapie-resistent gezüchteten NB Zellen ein Microarray basiertes Screening (DMH-Analyse) unter Verwendung einer 14.000 CpG-Inseln umfassenden Bibliothek durchgeführt. In diesem präklinischen Modell wurde das Zinkfingerprotein-Gen ZFP37 identifiziert, welches in Doxorubicin-resistenten LAN1 und Kelly Zellen und in Cisplatin-resistenten Kelly Zellen im Vergleich zu sensitiven Zellen hypermethyliert vorlag. Expressionsanalysen bestätigten die transkriptionale Repression von ZFP37 in resistenten versus sensitiven Zellen. Die ZFP37-Proteinexpression nahm in sensitiven Zellen dosisabhängig unter Doxorubicin-Inkubation zu, während sie in Doxo<sup>R</sup> Zellen weiter abnahm, was einen Mechanismus zur Expressionsinhibierung in resistenten Zellen nahelegt. Demethylierung der Zellen durch Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin stellte die ZFP37-Expression wieder her. Durch Bisulfit-Sequenzierung und Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) wurden leichte Differenzen zwischen der ZFP37 Methylierung in resistenten und sensitiven Zellen festgestellt. Die für die verminderte Expression verantwortliche Hypermethylierung liegt jedoch vermutlich außerhalb der analysierten Sequenzen.

Quantitative Real-Time PCR Expressionsanalysen mit 68 primären Tumoren zeigten einen Zusammenhang zwischen einer verminderten ZFP37-Expression und metastasierten NB. In primären NB wurde durch Genexpressionschip-Analysen eine inverse Korrelation zwischen der Expression von ZFP37 und den resistenzassoziierten Genen MGMT und ABCC4 beobachtet. Die Inhibition der ZFP37-Expression *in vitro* durch shRNS-Transfektion führte nicht zu einer Repression dieser Gene, was einen übergeordneten Mechanismus zur Regulation der Expression vermuten lässt. Diese Herunterregulation von ZFP37 resultierte in einer gesteigerten Resistenz gegen Doxorubicin und Irinotecan. Die entwickelte Therapieresistenz war unabhängig von der Expression des Multidrug Resistance Gens MDR1, so dass in weiteren Analysen

überprüft werden muss, wie die epigenetische Inhibition von ZFP37 an der Therapieresistenz beteiligt ist.

In dieser Arbeit wurde weiterhin das potentielle Tumorsuppressorgen IGSF4 auf seine epigenetische Regulation untersucht. In primären NB ist die verminderte Expression mit einer schlechten Prognose und fortgeschrittenen Stadien assoziiert. In den untersuchten primären NB war jedoch das DNS-Methylierungsmuster der Promotorregion von IGSF4 in allen Stadien gleich. Die verminderte Expression im NB wird somit im Gegensatz zu anderen Krebsarten nicht durch eine Hypermethylierung des Promotors verursacht. Da eine Deletion oder Mutation des Gens ausgeschlossen werden konnte, stehen weitere Analysen zum Regulationsmechanismus von IGSF4, wie z.B. eine Histondeacetylierung oder die Überexpression von Repressoren, aus.

Für einen globalen Überblick stellen Hochdurchsatzsequenzierungen von methylierten und unmethylierten DNS Bereichen einen vielversprechenden Ansatz dar. Die Kombination der Analyse epigenetischer und genetischer Informationen wird zu einem besseren Verständnis der molekularen Resistenzmechanismen im NB beitragen.



## Literaturverzeichnis

- Aktas, S., A. C. Celebiler, et al. "Expression and methylation pattern of p16 in neuroblastoma tumorigenesis." Pathol Oncol Res **16**(1): 1-6.
- Alaminos, M., V. Davalos, et al. (2004). "Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma." J Natl Cancer Inst **96**(16): 1208-19.
- Ando, K., M. Ohira, et al. (2008). "Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation." Int J Cancer **123**(9): 2087-94.
- Bachman, K. E., B. H. Park, et al. (2003). "Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene." Cancer Cell **3**(1): 89-95.
- Bestor, T. H. (1998). "The host defence function of genomic methylation patterns." Novartis Found Symp **214**: 187-95; discussion 195-9, 228-32.
- Biard, D. S., E. Despras, et al. (2005). "Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing." Mol Cancer Res **3**(9): 519-29.
- Bock, C., S. Reither, et al. (2005). "BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing." Bioinformatics **21**(21): 4067-8.
- Bown, N., S. Cotterill, et al. (1999). "Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma." N Engl J Med **340**(25): 1954-61.
- Breslow, N. and B. McCann (1971). "Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma." Cancer Res **31**(12): 2098-103.
- Brodeur, G. M. (2003). "Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma." Nat Rev Cancer **3**(3): 203-16.
- Brodeur, G. M., J. E. Minturn, et al. (2009). "Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas." Clin Cancer Res **15**(10): 3244-50.
- Brodeur, G. M., J. Pritchard, et al. (1993). "Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment." J Clin Oncol **11**(8): 1466-77.
- Brodeur, G. M., R. C. Seeger, et al. (1988). "International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma." J. Clin. Oncol. **6**: 1874-1881.
- Brodeur, G. M., R. C. Seeger, et al. (1984). "Amplification of N-Myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease stage." Science **224**: 1121-1124.
- Chalk, A. M., C. Wahlestedt, et al. (2004). "Improved and automated prediction of effective siRNA." Biochem Biophys Res Commun **319**(1): 264-74.
- Chekhun, V. F., G. I. Kulik, et al. (2006). "Role of DNA hypomethylation in the development of the resistance to doxorubicin in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells." Cancer Lett **231**(1): 87-93.
- Chen, H. Y., C. J. Shao, et al. (2009). "Role of ERCC1 promoter hypermethylation in drug resistance to cisplatin in human gliomas." Int J Cancer.
- Cheung, H. H., T. L. Lee, et al. (2009). "DNA methylation of cancer genome." Birth Defects Res C Embryo Today **87**(4): 335-50.
- Cimmino, F., J. H. Schulte, et al. (2009). "Galectin-1 is a major effector of TrkB-mediated neuroblastoma aggressiveness." Oncogene **28**(19): 2015-23.

- Cohn, S. L., A. W. Rademaker, et al. (1990). "Analysis of DNA ploidy and proliferative activity in relation to histology and N-myc amplification in neuroblastoma." Am J Pathol **136**(5): 1043-52.
- Cole, K. A., E. F. Attiyeh, et al. (2008). "A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene." Mol Cancer Res **6**(5): 735-42.
- Costello, J. F. and C. Plass (2001). "Methylation matters." J Med Genet **38**(5): 285-303.
- De Preter, K., J. Vandesompele, et al. (2006). "Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes." Genome Biol **7**(9): R84.
- Dreyer, S. D., L. Zhou, et al. (1998). "Cloning, characterization, and chromosomal assignment of the human ortholog of murine Zfp-37, a candidate gene for Nager syndrome." Mamm Genome **9**(6): 458-62.
- Ebinger, M., L. Senf, et al. (2004). "Promoter methylation pattern of caspase-8, P16INK4A, MGMT, TIMP-3, and E-cadherin in medulloblastoma." Pathol Oncol Res **10**(1): 17-21.
- Eggert, A., M. A. Grotzer, et al. (2001). "Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression." Cancer Res **61**(4): 1314-9.
- Ehrlich, M. (2002). "DNA methylation in cancer: too much, but also too little." Oncogene **21**(35): 5400-13.
- Eisele, L., L. Klein-Hitpass, et al. (2007). "Differential expression of drug-resistance-related genes between sensitive and resistant blasts in acute myeloid leukemia." Acta Haematol **117**(1): 8-15.
- Esteller, M. (2005). "DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations." Curr Opin Oncol **17**(1): 55-60.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers." Biochem Biophys Res Commun **111**(1): 47-54.
- Fukami, T., H. Fukuhara, et al. (2003). "Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines." Int J Cancer **107**(1): 53-9.
- Fuks, F., W. A. Burgers, et al. (2000). "DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity." Nat Genet **24**(1): 88-91.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." J Mol Biol **196**(2): 261-82.
- Gerson, S. L. (2002). "Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer." J Clin Oncol **20**(9): 2388-99.
- Gilman, A. L., M. F. Ozkaynak, et al. (2009). "Phase I study of ch14.18 with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 in children with neuroblastoma after autologous bone marrow transplantation or stem-cell rescue: a report from the Children's Oncology Group." J Clin Oncol **27**(1): 85-91.
- Grotzer, M. A., D. Castelletti, et al. (2009). "Targeting Myc in pediatric malignancies of the central and peripheral nervous system." Curr Cancer Drug Targets **9**(2): 176-88.
- Hann, H. W., H. M. Levy, et al. (1980). "Serum ferritin as a guide to therapy in neuroblastoma." Cancer Res **40**(5): 1411-3.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, et al. (2004). "Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide." Clin Cancer Res **10**(6): 1871-4.
- Hoebeeck, J., E. Michels, et al. (2009). "Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma." Cancer Lett **273**(2): 336-46.

- Houghton, P. J., C. F. Stewart, et al. (2000). "Antitumor activity of temozolomide combined with irinotecan is partly independent of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair phenotypes in xenograft models." Clin Cancer Res **6**(10): 4110-8.
- Houshmandi, S. S., E. I. Surace, et al. (2006). "Tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) functions as a glioma tumor suppressor." Neurology **67**(10): 1863-6.
- Ikeda, H., T. Iehara, et al. (2002). "Experience with International Neuroblastoma Staging System and Pathology Classification." Br J Cancer **86**(7): 1110-6.
- Ito, T., Y. Shimada, et al. (2003). "Involvement of TSLC1 in progression of esophageal squamous cell carcinoma." Cancer Res **63**(19): 6320-6.
- Jabbour, E., J. P. Issa, et al. (2008). "Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies." Cancer **112**(11): 2341-51.
- Keshelava, N., S. Groshen, et al. (2000). "Cross-resistance of topoisomerase I and II inhibitors in neuroblastoma cell lines." Cancer Chemother Pharmacol **45**(1): 1-8.
- Kimmig, B., W. E. Brandeis, et al. (1986). "[Scintigraphic diagnosis of neuroblastoma using meta-iodobenzylguanidine]." Klin Padiatr **198**(3): 224-9.
- Kowalczyk, A., M. Gil, et al. (2009). "The GD2-specific 14G2a monoclonal antibody induces apoptosis and enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in IMR-32 human neuroblastoma cells." Cancer Lett **281**(2): 171-82.
- Kuramochi, M., H. Fukuhara, et al. (2001). "TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer." Nat Genet **27**(4): 427-30.
- Li, E. (2002). "Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development." Nat Rev Genet **3**(9): 662-73.
- Li, L. C. and R. Dahiya (2002). "MethPrimer: designing primers for methylation PCRs." Bioinformatics **18**(11): 1427-31.
- Look, A. T., F. A. Hayes, et al. (1984). "Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma." N Engl J Med **311**(4): 231-5.
- Luczak, M. W. and P. P. Jagodzinski (2006). "The role of DNA methylation in cancer development." Folia Histochem Cytobiol **44**(3): 143-54.
- Maris, J. M., M. D. Hogarty, et al. (2007). "Neuroblastoma." Lancet **369**(9579): 2106-20.
- Martin, L. P., T. C. Hamilton, et al. (2008). "Platinum resistance: the role of DNA repair pathways." Clin Cancer Res **14**(5): 1291-5.
- Matthay, K. K., J. G. Villablanca, et al. (1999). "Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group." N Engl J Med **341**(16): 1165-73.
- Mazarakis, N., D. Michalovich, et al. (1996). "Zfp-37 is a member of the KRAB zinc finger gene family and is expressed in neurons of the developing and adult CNS." Genomics **33**(2): 247-57.
- Merlo, A., J. G. Herman, et al. (1995). "5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor *p16/CDKN2/MTS1* in human cancers." Nat. Med. **1**: 686-692.
- Michels, E., J. Hoebeeck, et al. (2008). "CADM1 is a strong neuroblastoma candidate gene that maps within a 3.72 Mb critical region of loss on 11q23." BMC Cancer **8**: 173.
- Miller, W. H., Jr. (1998). "The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer." Cancer **83**(8): 1471-82.

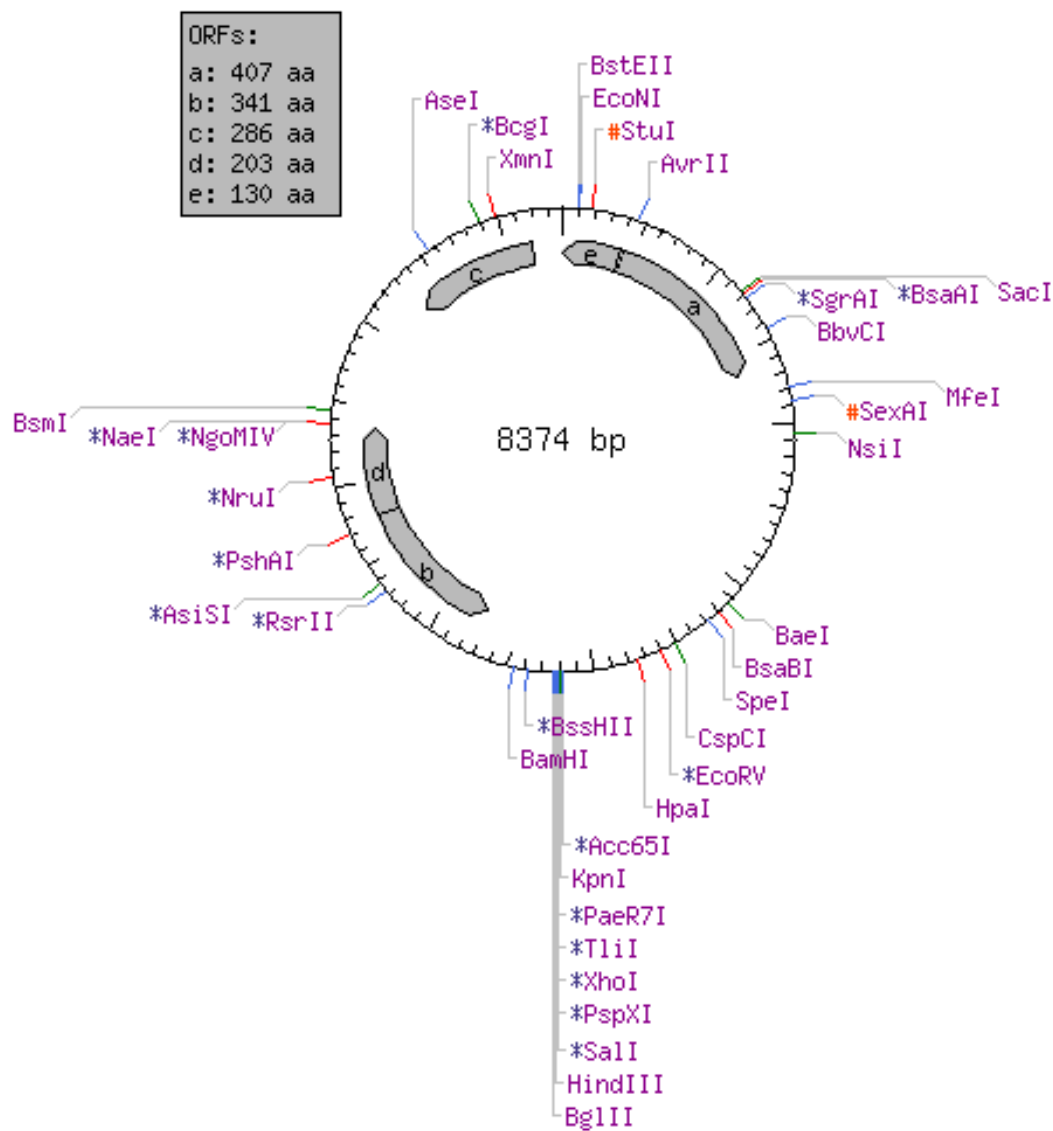
- Misawa, A., S. Tanaka, et al. (2009). "RASSF1A hypermethylation in pretreatment serum DNA of neuroblastoma patients: a prognostic marker." Br J Cancer **100**(2): 399-404.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of Immunological Methods **65**: 55-63.
- Nakagawara, A., M. Arima-Nakagawara, et al. (1993). "Association between high levels of expression of the Trk gene and favorable outcome in human neuroblastomas." N. Engl. J. Med. **328**: 847-854.
- Nakagawara, A., C. G. Azar, et al. (1994). "Expression and function of Trk-B and BDNF in human neuroblastomas." Mol. Cell. Biol. **14**: 759-767.
- Nan, X., S. Cross, et al. (1998). "Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins." Novartis Found Symp **214**: 6-16; discussion 16-21, 46-50.
- Nawrocki, S. T., J. S. Carew, et al. (2005). "Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis." Cancer Res **65**(24): 11658-66.
- Norris, M. D., J. Smith, et al. (2005). "Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro." Mol Cancer Ther **4**(4): 547-53.
- Nowacki, S., M. Skowron, et al. (2008). "Expression of the tumour suppressor gene CADM1 is associated with favourable outcome and inhibits cell survival in neuroblastoma." Oncogene **27**(23): 3329-38.
- Oberthuer, A., F. Berthold, et al. (2006). "Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification." J Clin Oncol **24**(31): 5070-8.
- Patel, V. J., G. B. Elion, et al. (2000). "Schedule-dependent activity of temozolomide plus CPT-11 against a human central nervous system tumor-derived xenograft." Clin Cancer Res **6**(10): 4154-7.
- Payen, E., T. Verkerk, et al. (1998). "The centromeric/nucleolar chromatin protein ZFP-37 may function to specify neuronal nuclear domains." J Biol Chem **273**(15): 9099-109.
- Paz, M. F., S. Wei, et al. (2003). "Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colon cancer cells deficient in DNA methyltransferases." Hum Mol Genet **12**(17): 2209-19.
- Perez, C. A., K. K. Matthay, et al. (2000). "Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study." J Clin Oncol **18**(1): 18-26.
- Rabik, C. A. and M. E. Dolan (2007). "Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents." Cancer Treat Rev **33**(1): 9-23.
- Razin, A. (1998). "CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection." EMBO J **17**(17): 4905-8.
- Reed, J. C., L. Meister, et al. (1991). "Differential expression of bcl2 protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin." Cancer Res **51**(24): 6529-38.
- Robertson, K. D. (2002). "DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web." Oncogene **21**(35): 5361-79.
- Rockett, J. C., P. Patrizio, et al. (2004). "Gene expression patterns associated with infertility in humans and rodent models." Mutat Res **549**(1-2): 225-40.

- Schettino, C., M. A. Bareschino, et al. (2008). "The potential role of pharmacogenomic and genomic in the adjuvant treatment of early stage non small cell lung cancer." Curr Genomics **9**(4): 252-62.
- Schor, N. F. (2009). "New approaches to pharmacotherapy of tumors of the nervous system during childhood and adolescence." Pharmacol Ther **122**(1): 44-55.
- Schramm, A., J. H. Schulte, et al. (2005). "Prediction of clinical outcome and biological characterization of neuroblastoma by expression profiling." Oncogene **24**(53): 7902-12.
- Schulte, J. H., A. Schramm, et al. (2003). "Microarray-analysis: a new approach to study the molecular mechanisms of thermo-chemotherapy." Klin Padiatr **215**(6): 298-302.
- Schulz, G., D. A. Cheresch, et al. (1984). "Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients." Cancer Res **44**(12 Pt 1): 5914-20.
- Schwab, M., K. Alitalo, et al. (1983). "Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and neuroblastoma tumors." Nature **305**: 245-248.
- Schwab, M., F. Westermann, et al. (2003). "Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology." Lancet Oncol **4**(8): 472-80.
- Seeger, R. C., G. M. Brodeur, et al. (1985). "Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas." N Engl J Med **313**(18): 1111-6.
- Seeger, R. C., S. A. Rayner, et al. (1977). "Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines." Cancer Res **37**(5): 1364-71.
- Sharrard, R. M., J. A. Royds, et al. (1992). "Patterns of methylation of the c-myc gene in human colorectal cancer progression." Br J Cancer **65**(5): 667-72.
- Shen, L., Y. Kondo, et al. (2007). "Drug sensitivity prediction by CpG island methylation profile in the NCI-60 cancer cell line panel." Cancer Res **67**(23): 11335-43.
- Shimada, H., I. M. Ambros, et al. (1999). "The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system)." Cancer **86**(2): 364-72.
- Skehan, P., R. Storeng, et al. (1990). "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening." J Natl Cancer Inst **82**(13): 1107-12.
- Spitz, R., B. Hero, et al. (2003). "Gain of distal chromosome arm 17q is not associated with poor prognosis in neuroblastoma." Clin Cancer Res **9**(13): 4835-40.
- Spitz, R., B. Hero, et al. (2006). "Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma." Clin Cancer Res **12**(11 Pt 1): 3368-73.
- Steenbergen, R. D., D. Kramer, et al. (2004). "TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia." J Natl Cancer Inst **96**(4): 294-305.
- Tanaka, S., Y. Maeda, et al. (2004). "Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p." J Biol Chem **279**(14): 14256-63.
- Tang, X. X., M. E. Robinson, et al. (2004). "Favorable neuroblastoma genes and molecular therapeutics of neuroblastoma." Clin Cancer Res **10**(17): 5837-44.
- Tang, X. X., H. Zhao, et al. (2006). "The MYCN enigma: significance of MYCN expression in neuroblastoma." Cancer Res **66**(5): 2826-33.
- Tate, P. H. and A. P. Bird (1993). "Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression." Curr Opin Genet Dev **3**(2): 226-31.

- Teitz, T., J. M. Lahti, et al. (2001). "Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death." J Mol Med **79**(8): 428-36.
- Tomari, Y. and P. D. Zamore (2005). "Perspective: machines for RNAi." Genes Dev **19**(5): 517-29.
- Vanden Heuvel, J. P., P. Holden, et al. (1998). "Identification of a novel peroxisome proliferator responsive cDNA isolated from rat hepatocytes as the zinc-finger protein ZFP-37." Toxicol Appl Pharmacol **152**(1): 107-18.
- Wagner, L. M., K. R. Crews, et al. (2004). "Phase I trial of temozolomide and protracted irinotecan in pediatric patients with refractory solid tumors." Clin Cancer Res **10**(3): 840-8.
- Wagner, L. M. and M. K. Danks (2009). "New therapeutic targets for the treatment of high-risk neuroblastoma." J Cell Biochem **107**(1): 46-57.
- Wagner, L. M., R. E. McLendon, et al. (2007). "Targeting methylguanine-DNA methyltransferase in the treatment of neuroblastoma." Clin Cancer Res **13**(18 Pt 1): 5418-25.
- Weinstein, J. L., H. M. Katzenstein, et al. (2003). "Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma." Oncologist **8**(3): 278-92.
- Xia, Z., Z. Zhu, et al. (2008). "Specific reversal of MDR1/P-gp-dependent multidrug resistance by RNA interference in colon cancer cells." Oncol Rep **20**(6): 1433-9.
- Yan, P. S., C. M. Chen, et al. (2002). "Applications of CpG island microarrays for high-throughput analysis of DNA methylation." J Nutr **132**(8 Suppl): 2430S-2434S.

# Anhang

## Anhang 1



Vektorkarte pBD631

## Anhang 2

Abweichend methylierte Gene in Cisplatin-, Etoposid- oder Doxorubicin-resistenten LAN1 Zellen im Vergleich zu sensitiven Zellen. Angegeben ist das Verhältnis der Signalstärke der resistenten versus sensitiven Zellen: > 1,5 = Hypermethylierung in resistenten Zellen (rot markiert), < 0,5 = Hypomethylierung (grün) (Rep/Mito = repetitive/mitochondriale Sequenz, die Genbezeichnungen beruhen auf den Annotationen in GenBank® [www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank])

Chip-ID	CP <sup>R</sup>	Etop <sup>R</sup>	Doxo <sup>R</sup>	Gen	Lokus	Beschreibung
A2:18	0.338	<no data>	<no data>		5q13.3	
A20:2	0.336	0.156	0.494		4p11	
A3:14	0.411	<no data>	<no data>	Rep/Mito		
A3:17	0.299	<no data>	<no data>	AB078428/30	19q12	
A5:9	0.468	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
A8:17	0.389	<no data>	<no data>	TM4-B	19p13.2	tetraspanin TM4-B
B11:16	0.486	<no data>	<no data>		2p16.3	
B12:13	0.386	0.417	0.428		7q11.21	no gene
B12:17	0.537	<no data>	<no data>		1q21.1	
B16:10	0.314	<no data>	<no data>	PCDHA12	5q31.3	protocadherin alpha 12
B16:17	0.391	0.477	0.374	Rep/Mito		
B16:4	0.401	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
B17:20	0.420	<no data>	<no data>	CGI-01	1q24.3	Hypothetical protein FLJ14715.
B17:9	0.430	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
B2:20	0.429	<no data>	<no data>	NT_011387.371	20p12.1	
B2:4	0.369	0.422	<no data>		5q33.2	
B20:13	0.240	<no data>	<no data>	CFC1	2q21.1	Cryptic.
B5:15	0.491	<no data>	<no data>		18q21.1	
B6:16	0.512	0.341	<no data>		16q11.2	
B7:14	0.324	0.248	<no data>		10q11.1	no gene
B8:18	0.288	<no data>	<no data>	MDF1	6p21.1	MyoD family inhibitor
C10:20	0.334	<no data>	<no data>	VAX2	2p13.3	ventral anterior homeobox 2
C18:7	0.352	0.352	<no data>	AK002179	1p22.3	Hypothetical protein FLJ11317.
C23:20	0.358	<no data>	<no data>	AF424542	11q12.2	Homo sapiens rheumatoid arthritis synovial fibroblast L1 retrotransposon, partial sequence.
C24:12	0.432	0.246	<no data>	Rep/Mito		
C24:7	0.330	<no data>	<no data>	ZFP37	9q32	Zinc finger protein 37 homolog (Zfp-37).
C24:9	0.392	0.181	0.481	Rep/Mito		
C6:10	0.483	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
C6:20	0.437	<no data>	<no data>	D86966	15q25.3	Zinc finger protein 592.
C6:7	0.391	<no data>	<no data>	NBEA/MAB21L1	13q13.3	neurobeacin
C9:13	0.363	0.213	0.399		16q11.2	no gene
C9:17	0.456	0.210	<no data>			Chromosome 5 clone
D11:10	0.282	<no data>	<no data>	WINS1	15q26.3	WINS1 protein with Drosophila Lines (Lin) homologous domain.
D11:16	0.177	<no data>	<no data>		11q13.3	two pore segment channel 2
D12:10	0.415	<no data>	<no data>		4p11	
D12:15	0.355	<no data>	<no data>	AB0138317		Hypothetical protein KIAA0774
D14:18	0.340	<no data>	<no data>		6p22.1	no gene
D14:19	0.443	0.479	<no data>	Rep/Mito		



D14:6	0.288	<no data>	<no data>		3p14.1	no gene
D17:14	0.387	<no data>	<no data>	DCOIM	5q31.1	DcoH-like protein DCoHm (HNF1-alpha, hepatocyte nuclear factor-1 alpha dimerization cofactor).
D18:15	0.416	<no data>	<no data>	MTSS1		metastasis suppressor 1
D2:15	0.346	0.325	<no data>		Xq21.33	
D20:20	0.527	1.718	1.925	ZFP37	9q32	Zinc finger protein 37 homolog (Zfp-37).
D5:9	0.268	0.466	<no data>	SF3B3	16q22.1	SF3B3 protein.
D8:20	0.388	<no data>	<no data>	AY422473	9p22.3	Homo sapiens myosin tail domain-containing protein mRNA, complete cds.
E14:20	0.362	<no data>	<no data>	Rep/Mito		Human mRNA from Genbank (AF102686)
E18:18	0.318	<no data>	<no data>	NT_007592.449	6p22.1	
E18:8	0.476	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
E19:19	0.454	0.236	0.488			unspezifische Sequenz
E20:18	0.550	0.279	<no data>		9p21.1	
E21:13	0.393	0.351	0.441		19q12	no gene
E22:7	0.504	<no data>	<no data>	AK074627	16p11.2	Homo sapiens cDNA FLJ90146 fis, clone HEMBB1001623, highly similar to Homo sapiens orphan G protein-coupled receptor (GPR34) gene.
E3:7	0.450	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
E4:19	0.360	<no data>	<no data>	AK130282	1q21.1	CDNA FLJ26772 fis, clone PRS03245.
E5:18	0.438	<no data>	<no data>	NT_029419.563	12q14.1	
E8:16	0.515	<no data>	<no data>		9q32	zinc finger protein 37 homolog, Promotorregion, zw. CpG islands
E8:20	0.268	<no data>	<no data>	NT_034398.4, EST BM809018	1q21.1	CpG island
F12:18	0.311	<no data>	<no data>	ATP6V1G1	9q32	ATPase, H+ transporting, lysosomal (Vacuolar proton pump), member J.
F14:18	0.362	<no data>	<no data>		3q21.3	
F16:18	0.339	<no data>	<no data>		Yp11.2	
F19:17	0.487	0.161	0.446	Rep/Mito		
F19:18	0.487	<no data>	<no data>	AK057513	16q21	Human mRNA from Genbank
F19:5	0.496	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
F20:18	0.488	<no data>	<no data>	Rep/Mito		
F23:16	0.331	<no data>	<no data>		2q21.2	no gene
F24:17	0.466	<no data>	<no data>	XRCC4	5q14.2	DNA-repair protein XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4)
F3:8	0.392	<no data>	1.903	ZFP37	9q32	Zinc finger protein 37 homolog (Zfp-37).
F4:7	0.511	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
F6:19	0.379	<no data>	<no data>	BC030764	2p11.2	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4801360, with apparent retained intron
F6:20	0.460	1.710	1.726	ZFP37	9q32	Zinc finger protein 37 homolog (Zfp-37).
G10:20	0.353	0.455	<no data>	BX647589	2q37.2	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp31311130 (from clone DKFZp31311130), Promotorregion
G13:11	0.529	<no data>	<no data>	ZIC1	3q24	Zic family member 1
G13:19	0.502	<no data>	<no data>	CAV1	7q31.2	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa, promotor ?
G13:6	0.388	0.164	<no data>		10q11.1	
G14:1	0.305	0.152	0.512	KIAA1287	17q23.2	Hypothetical protein KIAA1287 (Fragment)
G14:20	0.333	<no data>	<no data>	NT_007592.102	6p23	Genscan Gene Prediction

G16:7	0.252	<no data>	<no data>	PCDHA3	5q31.3	protocadherin alpha 3
G18:10	0.292	<no data>	<no data>	Rep/Mito		
G18:7	0.327	0.354	<no data>	HSF2	6q22.31	heat shock transcription factor 2
G19:7	0.439	<no data>	<no data>		2q21.2	
G19:8	0.394	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
G23:13	0.365	0.211	<no data>		16q11.2	no gene
G23:6	0.325	0.293	0.439		19q12	
G24:18	0.425	0.320	<no data>	Rep/Mito		
G5:7	0.475	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
G9:18	0.351	<no data>	<no data>			DNA
H1:16	0.474	<no data>	<no data>		12q13.13	Homo sapiens cDNA FLJ31855 fis, clone NT2RP7000926
H11:17	0.424	<no data>	<no data>	PKIB	6q22.31	cAMP-dependent protein kinase inhibitor beta (PKIB)
H12:19	0.428	<no data>	<no data>	NT_007592.448	6p22.1	
H17:7	0.469	<no data>	<no data>		2q21.2	
H18:14	0.296	0.136	<no data>			CpG island
H19:4	0.408	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
H19:7	0.266	<no data>	1.540	ZFP37	9q32	Zinc finger protein 37 homolog (Zfp-37).
H21:17	0.254	<no data>	<no data>	MRPS18B/PPP1R10	6p21.33	mitochondrial ribosomal protein S18B
H22:17	0.348	<no data>	<no data>	PTPRT	20q12	protein tyrosine phosphatase, receptor type, T
H24:16	0.321	<no data>	<no data>	LHX4	1q25.2	LIM homeobox 4
H3:13	0.341	0.217	<no data>		19q12	no gene
H3:15	0.400	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
H5:19	0.363	0.427	<no data>	chr10_426.1	10q11.21	
H5:20	0.329	<no data>	<no data>	NINJ2	12p13.33	ninjurin 2
H5:8	0.372	<no data>	<no data>	ACTB		Hypothetical protein.
I12:12	0.409	0.330	<no data>	TRIB2	2p24.3	GS3955 (Tribbles homolog 2) (TRB2 protein).
I14:18	0.405	0.236	0.486	Rep/Mito		
I16:19	0.412	<no data>	0.446	NT_011669.s	Xq11.2	
I18:19	0.356	<no data>	<no data>	NT_007592.449	6p22.1	
I21:11	0.442	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
I22:16	0.518	<no data>	<no data>		22q11.21	proline dehydrogenase (oxidase) 1
I7:8	0.449	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
J12:12	0.463	<no data>	<no data>			Homo sapiens serine/threonine protein kinase Kp78 splice variant CTAK75a mRNA
J13:15	0.425	<no data>	<no data>	ENO1	1p36.23	enolase 1, (alpha)
J17:20	0.389	0.472	0.469	Rep/Mito		
J19:15	0.445	<no data>	<no data>			no matches found
J20:20	0.332	<no data>	<no data>		4p11	unspezifische Sequenz
J22:10	0.481	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
J8:9	0.480	<no data>	<no data>	CpG		CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
J9:13	0.385	<no data>	<no data>	DNAH7	2q32.3	Dynein
K11:10	0.390	0.449	<no data>	ELSPBP1	19q13.32	Seminal plasma protein-like protein.
K12:7	0.358	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187

K15:4	0.309	<no data>	<no data>	Rep/Mito		
K19:10	0.323	<no data>	<no data>		6p22.1	
K2:12	0.289	<no data>	<no data>	NKX6-1	4q21.23	NK6 transcription factor related, locus 1
K2:20	0.497	0.199	<no data>			unspezifische Sequenz
K20:17	0.385	0.459	<no data>		Xp21.3	no gene
K24:10	0.345	<no data>	<no data>	NT_078064.2	9q13	
K24:9	0.334	<no data>	<no data>			gamma-aminobutyric acid receptor A5 subunit (GABRA5) ?
K4:11	0.176	<no data>	<no data>	CFC1	2q21.1	Cryptic.
K8:18	0.455	<no data>	<no data>	NT_007592.448	6p22.1	
L13:10	0.455	<no data>	<no data>		2q21.2	no gene
L13:15	0.234	0.166	<no data>			alpha satellite DNA, D8Z2 gene (7e-42)
L17:7	0.334	0.414	<no data>			Chr. 14 DNA
L18:13	0.299	<no data>	<no data>	NT_033172.1	6p11.2	
L18:8	0.273	<no data>	2.307	BX641014	9p11.2	Human mRNA from Genbank
L19:4	0.430	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
L2:11	0.486	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
L21:20	0.403	0.182	0.485			Cloning vector, mRNA from HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma
L22:5	0.329	0.396	<no data>	NT_022517.378	3p24.3	
L24:13	0.362	<no data>	<no data>			unspezifische Sequenz
L5:16	0.327	0.206	<no data>	Rep/Mito		
M10:13	0.325	0.410	0.435	PGAP1	2q33.1	GPI deacylase
M10:7	0.467	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
M12:17	0.334	<no data>	<no data>	FLJ11142	3q13.2	
M19:13	0.387	0.379	<no data>		16q11.2	unspezifische Sequenz
M2:20	0.364	<no data>	<no data>			Cloning vector, mRNA from HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma
M7:10	0.180	<no data>	<no data>	UNQ3030	3q29	Similar to RIKEN cDNA E430025L02 gene.
M7:14	0.255	<no data>	<no data>	TTC4	1p32.3	tetratricopeptide repeat domain 4
M9:19	0.514	<no data>	<no data>			serine/threonine protein kinase Kp78 splice variant CTAK75a mRNA, 18S rRNA
N1:20	0.438	<no data>	<no data>	Rep/Mito		
N1:5	0.394	0.077	<no data>		4p11	
N15:13	0.385	<no data>	<no data>	CAV1	7q31.2	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa, promotor ?
N17:16	0.408	0.268	0.534	LHX4	1q25.2	LIM homeobox 4
N17:17	0.513	<no data>	<no data>		1q21.1	unspezifische Sequenz
N2:15	0.456	0.536	<no data>	Rep/Mito		NADH dehydrogenase 4 (MTND4)
N2:16	0.340	0.235	<no data>		18q11.1	hinter ROCK1
N2:20	0.405	0.347	0.471	Rep/Mito		
N20:16	0.421	<no data>	<no data>	WWP1	8q21.3	Nedd-4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP1 (EC 6.3.2.-), (WW domain-containing protein 1) (Atropin-1 interacting protein 5) (AIP5).
N21:10	0.463	<no data>	<no data>		5p15.33	
N21:16	0.412	0.187	0.456			unspezifische Sequenz
N24:10	0.435	<no data>	<no data>		5p15.33	
N6:16	0.427	0.309	0.504	unspez.	10q11.21	HERV-K LTR element
N7:10	0.312	<no data>	<no data>	EAP30	17q21.32	EAP30 subunit of ELL complex.
N8:15	0.396	<no data>	1.373			no matches found
N8:16	0.492	0.227	<no data>		4	

N8:5	0.293	<no data>	<no data>	MASTL	10p12.1	Hypothetical protein FLJ90323.
O1:11	0.389	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
O11:11	0.396	0.224	0.394		4	
O11:14	0.476	<no data>	<no data>	Rep/Mito	1q21.1	
O12:10	0.384	<no data>	<no data>		9p11.2	no gene
O12:15	0.408	<no data>	1.745	NT_033172.1	6p11.2	
O14:4	0.342	<no data>	<no data>	Rep/Mito		
O17:10	0.311	<no data>	<no data>		Xp22.33	
O17:16	0.350	<no data>	<no data>			Chromosome 16 clone
O18:13	0.515	0.179	<no data>			unspezifische Sequenz
O2:2	0.389	<no data>	<no data>	ZNF285	19q13.31	Zinc finger protein 37 homolog (Zfp-37).
O22:18	0.488	0.278	<no data>		16q11.2	no gene
O22:20	0.491	<no data>	<no data>	Rep/Mito		
O24:13	0.473	0.135	<no data>	Rep/Mito		
O24:5	0.307	<no data>	<no data>	TP53TG3	16p11.2	novel TP53-inducible gene, Promotorregion, CpG Island
O3:12	0.389	0.388	<no data>	SERPING1	11q12.1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1
O3:14	0.340	0.213	<no data>			no matches found
O3:9	0.374	0.162	<no data>	Rep/Mito		
O4:14	0.340	<no data>	<no data>	NT_007592.449	6p22.1	
O5:5	0.265	0.456	<no data>		20	
O6:16	0.295	<no data>	<no data>		3q27.2	
O6:2	0.343	0.358	<no data>		unspez.	
O8:14	0.370	<no data>	<no data>	BC034707	9p24.2	Similar to hypothetical protein FLJ20489, clone IMAGE:4755321, mRNA.
O8:6	0.357	0.147	<no data>			unspezifische Sequenz
P1:20	0.383	<no data>	<no data>	FMN2	1q43	Formin 2
P13:11	0.431	0.103	0.513	CpG	1q23.3	CpG29
P14:6	0.412	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
P15:15	0.265	<no data>	<no data>		1q22	Similar to RIKEN cDNA 2310042N02 gene.
P17:16	0.379	0.455	<no data>	NT_007592.446	6p22.1	
P19:18	0.355	0.450	<no data>	NT_037852.2	15q11.2	
P2:14	0.323	0.119	<no data>			CpG island
P3:17	0.283	<no data>	<no data>			unspezifische Sequenz
P5:11	0.436	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
P5:16	0.474	<no data>	<no data>	CpG	16p11.2/2q21.2	CpG430, EST's/ zw. CpG31u187
P8:16	0.328	0.223	0.457	unspez.	7q11.21	
P9:17	0.374	0.269	0.344	Rep/Mito		
A1:18	<no data>	0.250	<no data>		2p22.3	
C12:17	<no data>	0.351	<no data>		Xp21.3	no gene
D1:20	<no data>	0.141	<no data>	AY422473	9p22.3	Homo sapiens myosin tail domain-containing protein mRNA, complete cds.
D16:20	<no data>	0.118	<no data>			Cloning vector, B120ind1 mRNA, mRNA from HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma
F13:20	<no data>	0.384	<no data>	NT_022778.70	4q13.2	
G17:6	<no data>	0.126	<no data>		19q12	
I10:8	<no data>	3.489	<no data>	chr8_1210.1	8q22.2	
I4:1	<no data>	0.103	<no data>	Rep/Mito		

K17:18	<no data>	0.333	<no data>		Yq12	
L4:15	<no data>	0.311	<no data>		4p11	Unspezifische Sequenz
A9:6	<no data>	<no data>	2.285	Rep/Mito		
B17:2	<no data>	<no data>	2.734	Rep/Mito		
C14:18	<no data>	<no data>	1.878	Rep/Mito		
D16:17	<no data>	<no data>	1.869	Rep/Mito		
D7:14	<no data>	<no data>	1.909	BC041837	12q14.1	Human mRNA from Genbank
E11:15	<no data>	<no data>	1.468	Rep/Mito		
F19:2	<no data>	<no data>	1.554	Rep/Mito		
F7:10	<no data>	<no data>	1.824	Rep/Mito		
G6:12	<no data>	<no data>	1.694	Rep/Mito		
G7:14	<no data>	<no data>	2.220	Rep/Mito		
H10:16	<no data>	<no data>	1.666	Rep/Mito		
H12:9	<no data>	<no data>	1.722	TPX2	20q11.21	Hepatocellular carcinoma-associated antigen 90
H24:12	<no data>	<no data>	1.544	Rep/Mito		
I12:18	<no data>	<no data>	0.527	BC040943, BC012329, BC032724	1p36.11	Human mRNA from Genbank
K6:15	<no data>	<no data>	1.678	Rep/Mito		
L1:12	<no data>	<no data>	2.290	Rep/Mito		
L7:17	<no data>	<no data>	1.748	Rep/Mito		
N20:14	<no data>	<no data>	1.512	AF102686		Human mRNA from Genbank (AF102686)
O6:19	<no data>	<no data>	1.690	AF102686		Human mRNA from Genbank (AF102686)
O7:4	<no data>	<no data>	1.789	Rep/Mito		
P10:17	<no data>	<no data>	1.860	Rep/Mito		

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt vor allem Frau Prof. Dr. Angelika Eggert für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, die freundliche Betreuung und die vielfältige Förderung. Ich danke Ihr für Ihre produktiven, hilfreichen Ratschläge und die guten Arbeitsbedingungen.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Alexander Schramm für die vielen ideenreichen Gespräche, die wertvollen Anregungen und die exzellente und engagierte wissenschaftliche Betreuung meiner Promotion.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Opalka für die freundliche, schnelle Unterstützung und die konstruktive Kritik.

Herrn Prof. Dr. Esche danke ich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Waha und Frau Ehrentraut danke ich für die kompetenten Einweisungen in die Methylierungs-Analysen und die wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Bei Herrn Privatdozent Dr. Klein-Hitpaß und seiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Microarray-Analysen.

Frau Dr. Kathy Astrahantseff danke ich sehr für die vielen spannenden, lehrreichen und lustigen Gespräche zu Forschungs- und anderen Themen und die tollen Reisen.

Ein großes Dankeschön an die gesamte Arbeitsgruppe des hämatologisch-onkologischen Labors (besonders an Flora Cimmino, Stephanie Degen, Sabine Dreesmann, Andrea Drothler, Stephanie Freund, Dr. Steffi Kuhfittig-Kulle, Ellen Mahlow, Anja Rieb, Dr. Johannes H. Schulte, Dr. Harald Stephan und Gabi Walde) für die vielen Tips, die tatkräftige Unterstützung, die Beantwortung meiner vielen Fragen und die konstruktiven Diskussionen. Ich danke Ihnen für die guten Gespräche, Ihre Hilfsbereitschaft, die Schokolade und das tolle Arbeitsklima.

Herzlichsten Dank meiner Familie und meinen Freunden für Ihre liebevolle emotionale Unterstützung und das Vertrauen in das Gelingen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Stefan, der die Höhen und Tiefen meiner Promotion ertragen mußte, immer für mich da war und mir den Rücken freigehalten hat.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Anja Schumacher, geb. Fagin  
Geburtsdatum, -ort: 17.07.1976, Bochum  
Familienstand: Verheiratet  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

## Schulbildung

08/1983 – 06/1987 Grundschohle am Neggenborn in Bochum  
08/1987 – 06/1996 Lessing-Gymnasium in Bochum

## Berufsausbildung

09/1996 – 03/1999 Ausbildung zur Pharmazeutisch Technischen Assistentin an der PTA-Lehranstalt in Essen

## Studium

04/1999 – 04/2003 Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main  
05/2003 – 05/2004 Praktisches Jahr in der Urbanus Apotheke in Dortmund und in der Krankenhausapotheke der St. Elisabeth-Stiftung in Bochum  
07/2004 Approbation als Apothekerin

## Promotion

Seit 09/2004 An der Universitätskinderklinik Essen, Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Eggert

## Berufserfahrung

09/2008 – 12/2008 Dozentin an der PTA-Lehranstalt in Essen  
01/2009 – 10/2009 Apothekerin in der Apotheke im real,- Bochum  
Seit 11/2009 Leiterin der Apotheke im real,- Bochum

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Pharmako-epigenetische Untersuchungen zur Therapieresistenz im Neuroblastom“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Anja Schumacher befürworte.



Essen, den 15.04.2010

Prof. Dr. Angelika Eggert

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.



Essen, den 15.04.2010

Anja Schumacher

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.



Essen, den 15.04.2010

Anja Schumacher